

ACTA DE EVALUACIÓN DE LA TESIS DOCTORAL

Año académico 2016/17

DOCTORANDO: **ÁLVAREZ TWOSE, IVÁN**

PROGRAMA DE DOCTORADO: **D420 CIENCIAS DE LA SALUD**
DEPARTAMENTO DE: **MEDICINA Y ESPECIALIDADES MÉDICAS**
TITULACIÓN DE DOCTOR EN: **DOCTOR/A POR LA UNIVERSIDAD DE ALCALÁ**

En el día de hoy 23/06/17, reunido el tribunal de evaluación nombrado por la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado y Doctorado de la Universidad y constituido por los miembros que suscriben la presente Acta, el aspirante defendió su Tesis Doctoral, elaborada bajo la dirección de **LUIS M. ESCRIBANO MORA // JOSÉ ALBERTO ORFAO DE MATOS**.

Sobre el siguiente tema: **NUEVAS VARIANTES CLÍNICAS Y MOLECULARES DE MASTOCITOS: CARACTERIZACIÓN CLÍNICO-BIOLÓGICA E IMPLICACIONES TERAPÉUTICAS**


Finalizada la defensa y discusión de la tesis, el tribunal acordó otorgar la CALIFICACIÓN GLOBAL¹ de (no apto, aprobado, notable y sobresaliente): **SOBRESALIENTE**

Alcalá de Henares, 23 de junio de 2017


EL PRESIDENTE


Fdo.: M. Murillo

EL SECRETARIO


Fdo.: Antonio Torrel

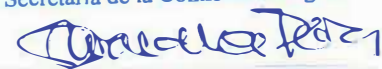
EL VOCAL


Fdo.: Mariana Pastells

Con fecha 29 de junio de 2017 la Comisión Delegada de la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado, a la vista de los votos emitidos de manera anónima por el tribunal que ha juzgado la tesis, resuelve:

- ☒ Conceder la Mención de "Cum Laude"
☐ No conceder la Mención de "Cum Laude"

La Secretaria de la Comisión Delegada


Fdo.: [Signature]

FIRMA DEL ALUMNO,

IVÁN ALVAREZ TWOSE
Fdo.: [Signature]

¹ La calificación podrá ser "no apto" "aprobado" "notable" y "sobresaliente". El tribunal podrá otorgar la mención de "cum laude" si la calificación global es de sobresaliente y se emite en tal sentido el voto secreto positivo por unanimidad.



Universidad
de Alcalá

COMISIÓN DE ESTUDIOS OFICIALES
DE POSGRADO Y DOCTORADO

En aplicación del art. 14.7 del RD. 99/2011 y el art. 14 del Reglamento de Elaboración, Autorización y Defensa de la Tesis Doctoral, la Comisión Delegada de la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado y Doctorado, en sesión pública de fecha 29 de junio, procedió al escrutinio de los votos emitidos por los miembros del tribunal de la tesis defendida por *ÁLVAREZ TWOSE, IVÁN*, el día 23 de junio de 2017, titulada *NUEVAS VARIANTES CLÍNICAS Y MOLECULARES DE MASTOCITOS: CARACTERIZACIÓN CLÍNICO-BIOLÓGICA E IMPLICACIONES TERAPÉUTICAS*, para determinar, si a la misma, se le concede la mención "cum laude", arrojando como resultado el voto favorable de todos los miembros del tribunal.

Por lo tanto, la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado resuelve otorgar a dicha tesis la

MENCIÓN "CUM LAUDE"

Alcalá de Henares, 11 julio de 2017
EL PRESIDENTE DE LA COMISIÓN DE ESTUDIOS
OFICIALES DE POSGRADO Y DOCTORADO



Firmado digitalmente por VELASCO
PEREZ JUAN RAMON - DNI:
03087239H
Fecha: 2017.07.12 15:32:01 +02'00'

Juan Ramón Velasco Pérez

Copia por e-mail a:

Doctorando: *ÁLVAREZ TWOSE, IVÁN*

Secretario del Tribunal: *ANTONIO TORRELO FERNÁNDEZ*.

Directores de Tesis: *LUIS M. ESCRIBANO MORA // JOSÉ ALBERTO ORFAO DE MATOS*

***Melchor Álvarez de Mon Soto, Catedrático de Medicina y Director del
Departamento de Medicina y Especialidades Médicas***

INFORMA QUE:

En su opinión, el trabajo de investigación presentado por D. **Iván Álvarez Twose** titulado **“Nuevas variantes clínicas y moleculares de mastocitosis: caracterización clínico-biológica e implicaciones terapéuticas”**, realizado bajo la dirección de los Dres. D. Luis Escribano Moran y D. José Alberto Orfao de Matos Correia e Vale, reúne los requisitos científicos, metodológicos, formales y de originalidad suficientes para ser defendido como Tesis Doctoral ante el Tribunal que legalmente proceda.

Y para que conste donde corresponda, a los efectos oportunos, se firma la presente en Alcalá de Henares a ocho de marzo de dos mil diecisiete.



LUIS ESCRIBANO MORA, Investigador Asociado, Servicio General de Citometría,
Universidad de Salamanca y Coordinador de la Red Española de Mastocitosis (REMA),

y

JOSÉ ALBERTO ORFAO DE MATOS CORREIA E VALE, Catedrático y Director
del Servicio General de Citometría, Centro de Investigación del Cáncer, Universidad de
Salamanca

CERTIFICAN

Que el trabajo titulado **“Nuevas variantes clínicas y moleculares de mastocitosis: caracterización clínico-biológica e implicaciones terapéuticas”** realizado por **D. Iván Álvarez Twose**, reúne los requisitos metodológicos y valor científico adecuados para ser presentado y defendido para optar al grado de Doctor por la Universidad de Alcalá.

Y para que así conste a los efectos oportunos, se expide el presente certificado en Alcalá de Henares, a 27 de Febrero de 2017



Luis Escribano Mora



José Alberto Orfao de Matos Correia e Vale



Universidad
de Alcalá

Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud

**NUEVAS VARIANTES CLÍNICAS Y
MOLECULARES DE MASTOCITOSIS:**
CARACTERIZACIÓN CLÍNICO-BIOLÓGICA E
IMPLICACIONES TERAPÉUTICAS

Tesis Doctoral presentada por:

IVÁN ÁLVAREZ TWOSE

Directores:

DR. LUIS ESCRIBANO MORA
DR. JOSÉ ALBERTO ORFAO DE MATOS CORREIA E VALE

Alcalá de Henares, 2017

Esta tesis doctoral está constituida por un compendio de ocho trabajos desarrollados en el Instituto de Estudios de Mastocitosis de Castilla La Mancha (CLMast, Toledo, España) en colaboración con el Servicio General de Citometría del Centro de Investigación del Cáncer (CIC, Salamanca, España), que conforman la Red Española de Mastocitosis (REMA), y financiados con fondos de:



AGRADECIMIENTOS

Sirvan estas líneas como una muestra de mi más sincero agradecimiento a todas las personas que, de una manera u otra, han contribuido a que esta tesis doctoral vea finalmente la luz.

Gracias a mis padres, por apoyarme en todas las decisiones que he tomado en mi vida, y muy particularmente por brindarme la posibilidad de estudiar Medicina. Sin vuestro sacrificio, este trabajo no sería hoy una realidad.

Gracias a todos mis compañeros de la REMA: Laura, Almudena, Ana, Andrés, María, Andrea, Carolina, Javi, Noelia, Manuela y los “desertores” José Mário y Cristina, por hacer que cada día aprenda cosas nuevas. Es un verdadero lujo trabajar con vosotros.

Gracias a Elena, Rosa, Beatriz, Juan Carlos y Marisa, por vuestra labor en la sombra, indispensable para un investigador.

Gracias a todos los colegas hematólogos, alergólogos, dermatólogos, internistas, reumatólogos y demás especialistas que han derivado a sus pacientes a la REMA.

Por supuesto, gracias a todos los pacientes que han acudido alguna vez al CLMast, por su siempre generosa predisposición a participar en los trabajos de investigación que llevamos a cabo.

Gracias a D. Roberto Sabrido y D. Fernando Lamata, exconsejeros de Sanidad de Castilla La Mancha cuando comenzó la andadura del CLMast, por creer en el proyecto de crear un Centro de Referencia de mastocitosis.

Gracias a Elena, por realizar el diseño gráfico y maquetación del trabajo.

Gracias a Rebeca, por tu paciencia a pesar de todo el tiempo que te he robado.

Finalmente, es un auténtico privilegio haber tenido la oportunidad de contar con el Dr. Escribano y el Dr. Orfao como directores de esta tesis. Gracias Alberto, por hacer sencillo lo que parece complejo, por aportar luz cuando solo hay sombras, y por guiarme día tras día en el duro camino de la investigación. Y gracias Luis, mi mentor, por descubrirme el apasionante mundo del mastocito y por haberme hecho partícipe de toda la sabiduría acumulada en tu materia gris. Jamás podré agradecerte lo suficiente haber hecho que ame mi trabajo.

TRIBUTO AL DR. ESCRIBANO
HOMENAJE A TODA UNA VIDA DEDICADA A LA MASTOCITOSIS

*En un lugar de la Mancha
Del reino, otrora, capital
Donde abunda el cigarral
Y la tierra es plana y ancha
No ha mucho tiempo que moraba
No un hidalgo enajenado,
Sino un galeno admirado,
Por su brillante carrera
Que más de uno quisiera
Aunque fuera de prestado.*

*Lucense de nacimiento
Y madrileño de adopción,
Con paciencia y dedicación,
Hizo un gran descubrimiento.
El hallazgo consistía
En poder identificar
Dentro de un flujo laminar
Al dichoso mastocito
Que a él le tenía contrito
Por su aspecto singular.*

*Más tarde vio este buen doctor
Licenciado en Medicina
Que una cierta proteína,
De interleuquina receptor,
Casi siempre se expresaba
En la membrana exterior
Del mastocito portador
De alteraciones clonales,
Mas no así en los normales,
Lo cual tiene un gran valor.*

*Hasta el punto que hoy en día
Es criterio de diagnosis
Para las mastocitosis,
Y el más útil, juraría,
Ya que hay pocos mastocitos
En médula, incluso afecta,
Pero el método detecta
Tales nimias poblaciones
Y es en estas condiciones
Una técnica perfecta.*

*De ahí en adelante
Charlas cientos, conferencias,
Y a congresos asistencias
Hasta un punto extenuante.
Entrevistas en la tele,
E innumerables manuscritos
En los que los mastocitos
Fueron los protagonistas
De magníficas revistas
Y de journals exquisitos.*

*El prestigio acumulado
Finalmente dio su fruto
Y así Don Luis creó un Instituto
En Toledo situado.
Ya lo reza con orgullo
El letrero de su entrada
Que al paciente siempre agrada:
Es el Centro Referencia
Dedicado a la dolencia
De la célula cebada.*

*Darí­a todo lo que sé
por la mitad de lo que ignoro*

RENÉ DESCARTES

A mis pacientes

ARTÍCULOS CIENTÍFICOS INCLUIDOS EN LA TESIS

OBJETIVO 1. IDENTIFICACIÓN DE FACTORES PRONÓSTICOS EN LA MASTOCITOSIS SISTÉMICA INDOLENTE.

Artículo I.

Título: Prognosis in adult indolent systemic mastocytosis: A long-term study of the Spanish Network on Mastocytosis in a series of 145 patients.

Autores: Luis Escribano*, **Iván Álvarez-Twose***, Laura Sánchez-Muñoz, Andrés García-Montero, Rosa Núñez, Julia Almeida, María Jara-Acevedo, Cristina Teodósio, Mónica García-Cosío, Carmen Bellas y Alberto Orfao.

*Ambos autores han contribuido de idéntica manera al trabajo y ambos deben ser considerados como primer autor del mismo.

Revista: *J Allergy Clin Immunol* 2009;124(3):514-521.

OBJETIVO 2. CARACTERIZACIÓN DE LA MASTOCITOSIS SISTÉMICA SIN LESIÓN CUTÁNEA ASOCIADA A ANAFILAXIA Y SUS IMPLICACIONES PRONÓSTICAS Y TERAPÉUTICAS.

Artículo II.

Título: Clinical, biological and molecular characteristics of clonal mast cell disorders presenting with mast cell activation symptoms.

Autores: **Iván Álvarez-Twose***, David González-de-Olano*, Laura Sánchez-Muñoz, Almudena Matito, Maria Isabel Esteban-López, Arancha Vega, Maria Belén Mateo, Maria Dolores Alonso Díaz de Durana, Belén de la Hoz, Maria Dolores del Pozo Gil, Teresa Caballero, Ana Rosado, Isabel Sánchez Matas, Cristina Teodósio, María Jara-Acevedo, Manuela Mollejo, Andrés García-Montero, Alberto Orfao y Luis Escribano.

*Ambos autores han contribuido de idéntica manera al trabajo y ambos deben ser considerados como primer autor del mismo.

Revista: *J Allergy Clin Immunol* 2010;125(6):1269-1278.

Artículo III.

Título: Validation of the REMA score for predicting mast cell clonality and systemic mastocytosis in patients with systemic mast cell activation symptoms.

Autores: Iván Álvarez-Twose, David González-de-Olano, Laura Sánchez-Muñoz, Almudena Matito, María Jara-Acevedo, Cristina Teodósio, Andrés García-Montero, José Mário Morgado, Alberto Orfao y Luis Escribano.

Revista: *Int Arch Allergy Immunol* 2011;157(3):275-280.

Artículo IV.

Título: Nonaggressive systemic mastocytosis (SM) without skin lesions associated with insect-induced anaphylaxis shows unique features versus other indolent SM.

Autores: Iván Álvarez-Twose, Roberta Zanotti, David González-de-Olano, Patrizia Bonadonna, Arancha Vega, Almudena Matito, Laura Sánchez-Muñoz, José Mário Morgado, Omar Perbellini, Andrés García-Montero, Giovanna De Matteis, Cristina Teodósio, Maurizio Rossini, María Jara-Acevedo, Donatella Schena, Andrea Mayado, Alberto Zamò, Manuela Mollejo, Paula Sánchez-López, Nieves Cabañes, Alberto Orfao y Luis Escribano.

Revista: *J Allergy Clin Immunol* 2013;133(2):520-528.

OBJETIVO 3. CARACTERIZACIÓN DE LA MASTOCITOSIS SISTÉMICA BIEN DIFERENCIADA Y SUS IMPLICACIONES PRONÓSTICAS Y TERAPÉUTICAS.

Artículo V.

Título: Clinical, immunophenotypic, and molecular characteristics of well-differentiated systemic mastocytosis.

Autores: Iván Álvarez-Twose, María Jara-Acevedo, José Mário Morgado, Andrés García-Montero, Laura Sánchez-Muñoz, Cristina Teodósio, Almudena Matito, Andrea Mayado, Carolina Caldas, Manuela Mollejo, Alberto Orfao y Luis Escribano.

Revista: *J Allergy Clin Immunol* 2016;137(1):168-178.

ARTÍCULO VI.

Título: Complete response after imatinib mesylate therapy in a patient with well-differentiated systemic mastocytosis.

Autores: Iván Álvarez-Twose, Pablo González, José Mário Morgado, María Jara-Acevedo, Laura Sánchez-Muñoz, Almudena Matito, Manuela Mollejo, Alberto Orfao y Luis Escribano.

Revista: *J Clin Oncol* 2012;30(12):e126-129.

ARTÍCULO VII.

Título: Imatinib in systemic mastocytosis: a phase IV clinical trial in patients lacking exon 17 *KIT* mutations and review of the literature.

Autores: Iván Álvarez-Twose, Almudena Matito, José Mário Morgado, Laura Sánchez-Muñoz, María Jara-Acevedo, Andrés García-Montero, Andrea Mayado, Carolina Caldas, Cristina Teodósio, Javier Ignacio Muñoz-González, Manuela Mollejo, Luis Escribano y Alberto Orfao.

Revista: *Oncotarget* 2016 (publicado online el 19 de Julio; doi:10.18632/oncotarget.10711; pendiente de transición al volumen definitivo).

ARTÍCULO VIII.

Título: Complete response to gemtuzumab ozogamicin in a patient with refractory mast cell leukemia.

Autores: Iván Álvarez-Twose, Pilar Martínez-Barranco, Jason Gotlib, Andrés García-Montero, José Mário Morgado, María Jara-Acevedo, Jason D. Merker, Francisco Javier Peñalver, Almudena Matito, Yanli Hou, Laura Sánchez-Muñoz, Andrea Mayado, Manuela Mollejo, Luis Escribano y Alberto Orfao.

Revista: *Leukemia* 2016;30(8):1753-1756.

BIBLIOMETRÍA DE LOS ARTÍCULOS INCLUIDOS EN LA TESIS

ARTÍCULO	AÑO	REVISTA	RANKIG* (categoría)	CUARTIL*	FACTOR DE IMPACTO*	CITACIONES‡
I	2009	JACI	1/25 (Alergia)	Q1	9.165	154
II	2010	JACI	1/25 (Alergia)	Q1	9.273	113
III	2011	IAAI	11/25 (Alergia)	Q2	2.403	41
IV	2013	JACI	1/25 (Alergia)	Q1	11.248	39
V	2015	JACI	1/25 (Alergia)	Q1	12.485	6
VI	2012	JCO	5/213 (Oncología)	Q1	18.038	32
VII	2016	Oncotarget	36/213 (Oncología)	Q1	6.359	0
VIII	2016	Leukemia	1/70 (Hematología)	Q1	12.104	1
Total					81.075	386
Media					10.134	48

JACI, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*; IAAI, *International Archives of Allergy and Immunology*; JCO, *Journal of Clinical Oncology*.

*Según datos de la agencia Thomas-Reuters en el año de publicación correspondiente (*Journal Citation Reports*, JCR).

‡A fecha de enero de 2017.

ÍNDICE

1. CAPÍTULO PRIMERO. INTRODUCCIÓN	25
1.1. BIOLOGÍA DEL MASTOCITO	27
1.1.1. ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DEL MASTOCITO	27
1.1.2. ONTOGENIA Y DESARROLLO DEL MASTOCITO	29
1.1.3. CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS DEL MASTOCITO	30
1.1.4. ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DEL RECEPTOR KIT	32
1.1.5. MECANISMOS DE ACTIVACIÓN MASTOCITARIA	35
1.1.6. MEDIADORES MASTOCITARIOS	37
1.1.6.1. HISTAMINA	39
1.1.6.2. PROTEASAS NEUTRAS	39
1.1.6.3. PROTEOGLICANOS	41
1.1.6.4. MEDIADORES LIPÍDICOS	41
1.1.6.5. CITOQUINAS Y QUIMIOKINAS	42
1.2. MASTOCITOSIS	43
1.2.1. PREVALENCIA DE LA MASTOCITOSIS	48
1.2.2. MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LA MASTOCITOSIS	48
1.2.3. CLASIFICACIÓN DE LA MASTOCITOSIS	52
1.2.3.1. MASTOCITOSIS CUTÁNEA (CM)	53
1.2.3.1.1. MASTOCITOSIS CUTÁNEA MACULOPAPULAR (MPCM)	55
1.2.3.1.2. MASTOCITOSIS CUTÁNEA DIFUSA (DCM)	59
1.2.3.1.3. MASTOCITOMA CUTÁNEO	61
1.2.3.2. MASTOCITOSIS SISTÉMICA (SM)	62
1.2.3.2.1. MASTOCITOSIS SISTÉMICA INDOLENTE (ISM)	64
1.2.3.2.2. MASTOCITOSIS SISTÉMICA QUIESCENTE O “SMOLDERING” (SSM)	64
1.2.3.2.3. MASTOCITOSIS SISTÉMICA AGRESIVA (ASM)	65
1.2.3.2.4. MASTOCITOSIS SISTÉMICA ASOCIADA A OTRA HEMOPATÍA CLONAL DE LÍNEA NO MASTOCITARIA (SM-AHNMD o SM-AHN)	66
1.2.3.2.5. LEUCEMIA DE MASTOCITOS (MCL)	68
1.2.3.2.6. SARCOMA DE MASTOCITOS (MCS)	69
1.2.3.2.7. FORMAS PROVISIONALES DE MASTOCITOSIS	69
1.2.3.2.8. MASTOCITOSIS SISTÉMICA BIEN DIFERENCIADA (WDSM)	71
1.2.4. CRITERIOS DIAGNÓSTICOS DE MASTOCITOSIS	72
1.2.4.1. CRITERIOS DIAGNÓSTICOS DE MASTOCITOSIS CUTÁNEA	73
1.2.4.2. CRITERIOS DIAGNÓSTICOS DE MASTOCITOSIS SISTÉMICA	74
1.2.5. ALTERACIONES GENÉTICAS EN LA MASTOCITOSIS	81
1.2.6. TRATAMIENTO DE LA MASTOCITOSIS	83
1.2.6.1. MANEJO DE LOS SÍNTOMAS DE LIBERACIÓN DE MEDIADORES MASTOCITARIOS	86
1.2.6.1.1. MEDIDAS PREVENTIVAS	86
1.2.6.1.2. TRATAMIENTO ANTIMEDIADOR	88
1.2.6.1.2.1. ANTIHISTAMÍNICOS	88
1.2.6.1.2.2. ANTAGONISTAS DE METABOLITOS DEL ÁCIDO ARAQUIDÓNICO	90
1.2.6.1.2.3. ESTABILIZADORES DE LA MEMBRANA DEL MASTOCITO	91
1.2.6.1.3. TERAPIA ANTI-INMUNOGLOBULINA E	91
1.2.6.1.4. FOTOTERAPIA CON RADIACIÓN ULTRAVIOLETA	92
1.2.6.1.5. INMUNOTERAPIA FRENTE A VENENOS DE HIMENÓPTEROS	93
1.2.6.2. TRATAMIENTO CITORREDUCTOR	94
1.2.6.3. TERAPIAS DIRIGIDAS A DIANAS MOLECULARES	95
1.2.6.4. TRASPLANTE DE PRECURSORES HEMATOPOYÉTICOS	96
1.3. SÍNDROMES DE ACTIVACIÓN MASTOCITARIA	96

2. CAPÍTULO SEGUNDO. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS	101
3. CAPÍTULO TERCERO. MATERIALES, MÉTODOS Y RESULTADOS	105
3.1. IDENTIFICACIÓN DE FACTORES PRONÓSTICOS EN PACIENTES CON ISM	109
3.1.1. PROGNOSIS IN ADULT INDOLENT SYSTEMIC MASTOCYTOSIS: A LONG-TERM STUDY OF THE SPANISH NETWORK ON MASTOCYTOSIS IN A SERIES OF 145 PATIENTS	109
3.2. CARACTERIZACIÓN CLÍNICO-BIOLÓGICA DE LA ISMs- Y SUS IMPLICACIONES PRONÓSTICAS Y TERAPÉUTICAS	119
3.2.1. CLINICAL, BIOLOGICAL AND MOLECULAR CHARACTERISTICS OF CLONAL MAST CELL DISORDERS PRESENTING WITH MAST CELL ACTIVATION SYMPTOMS	119
3.2.2. VALIDATION OF THE REMA SCORE FOR PREDICTING MAST CELL CLONALITY AND SYSTEMIC MASTOCYTOSIS IN PATIENTS WITH SYSTEMIC MAST CELL ACTIVATION SYMPTOMS	133
3.2.3. NONAGGRESSIVE SYSTEMIC MASTOCYTOSIS (SM) WITHOUT SKIN LESIONS ASSOCIATED WITH INSECT-INDUCED ANAPHYLAXIS SHOWS UNIQUE FEATURES VERSUS OTHER INDOLENT SM	141
3.3. CARACTERIZACIÓN CLÍNICO-BIOLÓGICA DE LA WDSM Y SUS IMPLICACIONES PRONÓSTICAS Y TERAPÉUTICAS	157
3.3.1. CLINICAL, IMMUNOPHENOTYPIC, AND MOLECULAR CHARACTERISTICS OF WELL-DIFFERENTIATED SYSTEMIC MASTOCYTOSIS	157
3.3.2. COMPLETE RESPONSE AFTER IMATINIB MESYLATE THERAPY IN A PATIENT WITH WELL-DIFFERENTIATED SYSTEMIC MASTOCYTOSIS	171
3.3.3. IMATINIB IN SYSTEMIC MASTOCYTOSIS: A PHASE IV CLINICAL TRIAL IN PATIENTS LACKING EXON 17 KIT MUTATIONS AND REVIEW OF THE LITERATURE	177
3.3.4. COMPLETE RESPONSE TO GEMTUZUMAB OZOGAMICIN IN A PATIENT WITH REFRACTORY MAST CELL LEUKEMIA	193
4. CAPÍTULO CUARTO. DISCUSIÓN	199
4.1. FACTORES PRONÓSTICOS EN LA MASTOCITOSIS SISTÉMICA INDOLENTE	204
4.2. CARACTERIZACIÓN DE LA MASTOCITOSIS SISTÉMICA SIN LESIÓN CUTÁNEA ASOCIADA A ANAFILAXIA (ISM-S)	207
4.3. CARACTERIZACIÓN DE LA MASTOCITOSIS SISTÉMICA BIEN DIFERENCIADA (WDSM)	219
4.4. APLICACIONES PRÁCTICAS DE LOS RESULTADOS DE ESTA TESIS	231
4.4.1. PROPUESTA DE UNA NUEVA CLASIFICACIÓN CLÍNICA Y MOLECULAR DE LA MASTOCITOSIS	231
4.4.2. MAYOR EFICIENCIA EN IDENTIFICACIÓN DE PACIENTES CON PATOLOGÍA MASTOCITARIA DE NATURALEZA CLONAL	237
4.4.3. IMPACTO SOCIOECONÓMICO DERIVADO DE LA APLICACIÓN DEL SCORE DE LA REMA	240
4.4.4. IMPACTO EN LA TOMA DE DECISIONES TERAPÉUTICAS EN PACIENTES CON NUEVAS VARIANTES CLÍNICAS Y MOLECULARES DE MASTOCITOSIS	242
5. CAPÍTULO QUINTO. CONCLUSIONES	245
6. CAPÍTULO SEXTO. BIBLIOGRAFÍA	249

ABREVIATURAS

AA: ácido araquidónico

AINES: antiinflamatorios no esteroideos

ARN: ácido ribonucleico

ASM: mastocitosis sistémica agresiva (abreviado del inglés: “*aggressive systemic mastocytosis*”)

ASOqPCR: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (en tiempo real) empleando oligo-nucleótidos alelo-específicos (abreviado del inglés: “*quantitative polymerase chain reaction with allele-specific oligonucleotides*”)

ATP: trifosfato de adenosina

BMM: mastocitosis aislada de médula ósea (abreviado del inglés: “*bone marrow mastocytosis*”)

CEL: leucemia eosinofílica crónica (abreviado del inglés: “*chronic eosinophilic leukemia*”)

CID: coagulación intravascular diseminada

CM: mastocitosis cutánea (abreviado del inglés: “*cutaneous mastocytosis*”)

c-MCAS: síndrome de activación mastocitaria clonal (abreviado del inglés: “*clonal mast cell activation syndrome*”)

COX: ciclooxigenasa

CPA: carboxipeptidasa A

CR: receptor de complemento (abreviado del inglés: “*complement receptor*”)

DAG: diacilglicerol

DCM: mastocitosis cutánea difusa (abreviado del inglés: “*diffuse cutaneous mastocytosis*”)

ECNM: abreviado del inglés: “*European Competence Network on Mastocytosis*”

ERK: quinasa regulada por señales extracelulares (abreviado del inglés: “*extracellular signal-regulated kinase*”)

FACS: separación de células activadas por fluorescencia (abreviado del inglés: “*fluorescence-activated cell sorting*”)

FcεRI: receptor de alta afinidad para inmunoglobulina E

FcγR: receptor para inmunoglobulina G

FDA: abreviado del inglés: “*Food and Drug Administration*”

FSC: abreviado del inglés: “*forward scatter*”

GM-CSF: factor estimulante de colonias granulo-monocíticas (abreviado del inglés: “*granulocyte-monocytic colony-stimulating factor*”)

GTP: trifosfato de guanosina

HTA: hipertensión arterial

HUMARA: receptor de andrógenos humano (abreviado del inglés: “*human androgen receptor*”)

IAM: infarto agudo de miocardio

IFN-α: interferón *alfa*

IgG: inmunoglobulina G

IL: interleuquina

ISM: mastocitosis sistémica indolente (abreviado del inglés: “*indolent systemic mastocytosis*”)

ITAM: inmunoreceptor con secuencia de activación basada en tirosina (abreviado del inglés: “*immunoreceptor tyrosin-based activation motif*”)

ITIM: inmunoreceptor con secuencia de inhibición basada en tirosina (abreviado del inglés: “*immunoreceptor tyrosin-based inhibition motif*”)

JAK: quinasa *Janus* (abreviado del inglés: “*Janus kinase*”)

LAT: acoplador para activación de células T (abreviado del inglés: “*linker for activation of T cells*”)

LMA: leucemia mieloblástica aguda

LMC: leucemia mieloide crónica

LMMC: leucemia mielomonocítica crónica

LO: lipooxigenasa

LT: leucotrieno

MC: mastocito (abreviado del inglés: “*mast cell*”)

MCL: leucemia de mastocitos (abreviado del inglés: “*mast cell leukemia*”)

MCAS: síndrome de activación mastocitaria (abreviado del inglés: “*mast cell activation syndrome*”)

MCS: sarcoma de mastocitos (abreviado del inglés: “*mast cell sarcoma*”)

MIS: mastocitosis en la piel (abreviado del inglés: “*mastocytosis in the skin*”)

MMAS: síndrome de activación mastocitaria monoclonal (abreviado del inglés: “*monoclonal mast cell activation syndrome*”)

MML: leucemia mielomastocítica (abreviado del inglés: “*myelomastocytic leukemia*”)

MO: médula ósea

MPCM: mastocitosis cutánea maculopapular (abreviado del inglés: “*maculopapular cutaneous mastocytosis*”)

NGF: factor de crecimiento nervioso (abreviado del inglés: “*nerve growth factor*”)

NM: mastocitosis nodular (abreviado del inglés: “*nodular mastocytosis*”)

NMP: neoplasia mieloproliferativa

NTAL: acoplador para la activación de células no T (abreviado del inglés: “*non-T cell activation linker*”)

OMS: Organización Mundial de la Salud

PAF: factor activador de plaquetas (abreviado del inglés: “*platelet-activating factor*”)

PCR: reacción en cadena de la polimerasa (abreviado del inglés: “*polymerase chain reaction*”)

PDGFR: receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (abreviado del inglés: “*platelet-derived growth factor receptor*”)

PDGFRA: receptor *alfa* del factor de crecimiento derivado de plaquetas

PDGFRB: receptor *beta* del factor de crecimiento derivado de plaquetas

PG: prostaglandina

- PI3K:** fosfatidil inositol trifosfato quinasa
- PIP₃:** fosfatidil inositol trifosfato
- PKC:** proteína quinasa C
- PLC γ :** fosfolipasa C *gamma*
- PNA:** péptido ácido nucleico (abreviado del inglés: “*peptide-nucleic acid*”)
- PUVA:** fototerapia psoralen-ultravioleta A
- RAS:** de sarcoma murino (abreviado del inglés: “*rat sarcoma*”)
- REMA:** Red Española de Mastocitosis
- RFLP:** polimorfismos de longitud mediante fragmentos de restricción (abreviado del inglés: “*restriction fragment length polymorphisms*”)
- SCF:** factor de células madre (abreviado del inglés: “*stem cell factor*”)
- SH2:** homología tipo 2 con *Src* (abreviado del inglés: “*Src-homology 2*”)
- SHE:** síndrome hipereosinofílico
- SHP-1:** fosfatasa 1 con dominios homólogos a *Src* de tipo 2 (abreviado del inglés: “*Src-homology region 2 domain containing Phosphatase-1*”)
- Siglec:** lectina de la superfamilia de inmunoglobulinas fijadora de ácido siálico (abreviado del inglés: “*sialic acid binding Ig-like lectin*”)
- SM:** mastocitosis sistémica (abreviado del inglés: “*systemic mastocytosis*”)
- SM-AHNMD o SM-AHN:** mastocitosis sistémica asociada a otra hemopatía clonal de línea no mastocitaria (abreviado del inglés: “*systemic mastocytosis with an associated clonal haematological non-mast cell lineage disease or systemic mastocytosis with associated hematologic neoplasm*”)
- SMD:** síndrome mielodisplásico
- SOCS1:** supresor de la señalización de citoquinas tipo 1 (abreviado del inglés: “*suppressor of cytokine signaling 1*”)
- SSC:** abreviado del inglés: “*side scatter*”
- SSM:** mastocitosis sistémica quiescente o “*smoldering*” (abreviado del inglés: “*smoldering systemic mastocytosis*”)
- STAT:** transductores de señal y activadores de transcripción (abreviado del inglés: “*signal transducers and activators of transcription*”)
- t-ASM:** mastocitosis sistémica agresiva en transformación.
- TGF- β :** factor de crecimiento transformante *beta* (abreviado del inglés: “*transforming growth factor beta*”)
- TK:** tirosina-quinasa
- TLR:** receptor tipo *Toll* (abreviado del inglés: “*Toll-like receptor*”)
- TMEP:** *telangiectasia macularis eruptiva perstans*
- TNF α :** factor de necrosis tumoral *alfa* (abreviado del inglés: “*tumor necrosis factor alpha*”)
- TPO:** trombopoyetina
- TROCI:** infiltrado de células redondas triptasa positivas (abreviado del inglés: “*tryptase-positive round cell infiltrate*”)

UVA: fototerapia ultravioleta A

UVA1: fototerapia ultravioleta A de longitud de onda larga (340-400 nm)

UP: *urticaria pigmentosa*

VEGF: factor de crecimiento vasculo-endotelial (abreviado del inglés: “*vascular endothelial growth factor*”)

WDSM: mastocitosis sistémica bien diferenciada (abreviado del inglés: “*well-differentiated systemic mastocytosis*”)

1. CAPÍTULO PRIMERO

INTRODUCCIÓN

1.1. BIOLOGÍA DEL MASTOCITO

1.1.1. ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DEL MASTOCITO

El mastocito (MC) es una célula efectora del sistema inmune que fue identificada por primera vez en 1878 por Paul Ehrlich en virtud de sus particulares características tintoriales (1). En concreto, el MC posee una propiedad denominada metacromasia, que consiste en la capacidad de teñirse de un color diferente al de la solución colorante. Desde el punto de vista morfológico, el MC normal tiene un tamaño mediano (7-12 μm), forma redondeada u ovoide, aunque en ocasiones pueden adoptar morfología alargada o “en huso”, presenta un núcleo redondo u oval y abundantes gránulos basófilos de gran tamaño (0.2 a 0.8 μm) distribuidos ampliamente por todo el citoplasma, llegando incluso a ocultar el núcleo por completo (2) (**FIGURA 1**).

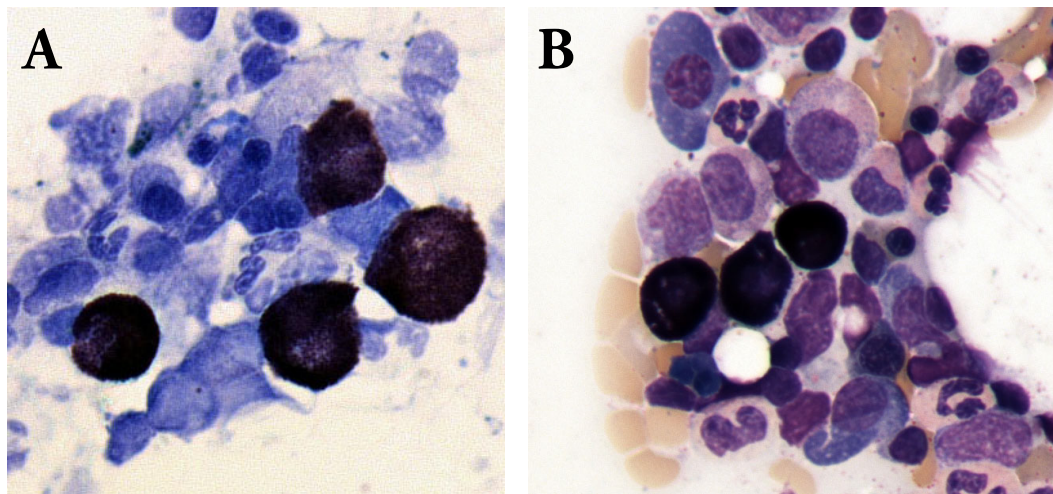


FIGURA 1. Morfología de mastocitos normales.

Extensiones de aspirado de médula ósea. **A**, tinción con azul de toluidina (x100); **B**, tinción con May-Grünwald-Giemsa (x100)

Desde el punto de vista funcional, el MC es una célula efectora del sistema inmune originada a partir de un precursor hematopoyético de médula ósea (MO) (3–6), desde donde migra todavía como célula inmadura a través de la circulación sanguínea a distintos tejidos como la piel y las mucosas, en los que termina su diferenciación (6,7). Así, una vez en los tejidos, el MC adquiere plena capacidad funcional bajo la influencia del

micromedioambiente tisular (8,9), desempeñando un papel central en los mecanismos de instauración y perpetuación de la respuesta inflamatoria (10–14).

A pesar de ser una célula minoritaria en comparación con el resto de células del sistema inmunológico, el MC se encuentra en prácticamente todos los tejidos, especialmente en aquellos que actúan como barrera física para microorganismos externos como son la piel y las mucosas de los tractos digestivo y respiratorio (15). Esta localización estratégica de los MCs, junto a la presencia en su superficie de numerosos receptores capaces de inducir activación en respuesta a diferentes estímulos, les permite actuar como primera línea de defensa frente a patógenos, alérgenos y otros agentes ambientales potencialmente nocivos. Así, determinados constituyentes bacterianos son capaces de activar directamente al MC a través de su interacción con receptores de membrana como son los receptores tipo *Toll* (TLRs, *Toll-like receptors*) (13,16,17) o CD48 (18–20). Además, el MC también expresa receptores para la inmunoglobulina G (FcγRI) y receptores de complemento (CR, abreviado del inglés: “*complement receptor*”), que son capaces de reconocer microorganismos previamente opsonizados (21–23). Entre los microorganismos frente a los que puede actuar el MC destacan parásitos (helmintos, nemátodos y protozoos), bacterias (especialmente Gram-negativas), determinados virus e incluso hongos. Tras el reconocimiento del patógeno, el MC pueden actuar frente al mismo de forma directa, bien por su capacidad fagocítica bajo determinadas circunstancias (19,24), o a través de la producción de péptidos antimicrobianos como la catelicidina (LL37) (25). Sin embargo, el MC desarrolla su función antimicrobiana sobre todo de manera indirecta, mediante la liberación de potentes mediadores (unos preformados y almacenados en sus gránulos y otros sintetizados *de novo*) que regulan la función vascular e inducen la activación de otras células del sistema inmune.

El proceso de liberación de mediadores mastocitarios ha sido ampliamente estudiado en las reacciones anafilácticas, en las que el MC actúa como la principal célula efectora. En estos casos, la activación se produce habitualmente a través de receptores de alta afinidad para la inmunoglobulina E (FcεRI) presentes en la membrana del MC, tras la exposición a un determinado alérgeno frente al que el individuo se ha sensibilizado previamente

(26,27). Finalmente, debido al papel clave que desempeña en la inflamación, el MC ha sido involucrado también en la patogénesis de enfermedades de naturaleza inflamatoria como la artritis reumatoide (28,29), la esclerodermia (30,31), la cistitis intersticial (32–35), la esclerosis múltiple (36,37) o el síndrome de intestino irritable (38–41), además de otros procesos como la cicatrización de heridas (42–44), la angiogénesis (45,46) o el desarrollo de tumores (47,48).

1.1.2. ONTOGENIA Y DESARROLLO DEL MASTOCITO

El MC se origina en la MO a partir de una célula precursora hematopoyética (3–6). Ahí, el MC comienza su maduración bajo la influencia de diversos factores de crecimiento y citoquinas, de los que merece destacar el factor de crecimiento de células progenitoras (SCF, abreviado del inglés: "*stem cell factor*"), además de interleuquinas (ILs) como la IL-4, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12, IL-15 ó IL-18, el factor de crecimiento nervioso (NGF, abreviado de inglés: "*nerve growth factor*"), el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β , abreviado del inglés: "*transforming growth factor beta*") y la trombopoyetina (TPO) (revisado en la referencia (49)). A diferencia del resto de células hematopoyéticas que completan su diferenciación en la MO, el MC aún inmaduro migra a través del torrente circulatorio hasta los tejidos periféricos, donde termina su diferenciación y residirá para ejercer sus funciones bajo la influencia del SCF y de diversas moléculas procedentes del microambiente tisular, entre las que se encuentran moléculas de adhesión como las integrinas y cadherinas, y las quimiocinas (revisado en la referencia (49)).

Una vez alcanzados los tejidos periféricos, el MC adquiere un fenotipo común independientemente del tejido donde se encuentre, que se caracteriza fundamentalmente por la expresión con alta intensidad de tres proteínas (50–52): 1) el antígeno CD117 (Kit), que actúa como receptor para SCF; 2) el receptor de alta afinidad para la IgE Fc ϵ RI, y 3) triptasa intracitoplasmática, principal constituyente proteico de los gránulos de los MCs de casi todos los tejidos. Así, de acuerdo con el perfil de expresión de triptasa y de otras proteasas, se pueden distinguir tres subtipos de MCs fenotípicamente diferentes según el tejido donde se encuentren (53,54): 1) MCs que solo contienen triptasa (MC_T) y se loca-

lizan en mucosas y en el tejido alveolar, 2) MCs que además de triptasa tienen también quimasa, carboxipeptidasa A (CPA) y catepsina-G (MC_{TC}), localizados en submucosas y piel, y 3) MCs que contienen quimasa, CPA y catepsina-G en ausencia de triptasa (MC_C), y que se encuentran en algunas submucosas como la intestinal y la nasal.

Por otra parte, existe también una importante heterogeneidad en cuanto al perfil de citoquinas que expresa cada subtipo de MC tisular. Así, mientras que la IL-4 se encuentra preferentemente en MC_{TC}, la producción de IL-5 e IL-6 está restringida a MC_T (55). Otras características diferenciales de las distintas subpoblaciones fenotípicas de MCs incluyen la dependencia de linfocitos T colaboradores CD4+ en el caso de los MC_T, y la expresión de CD88 (receptor del componente C5a del complemento) en los MC_{TC} (56). En conjunto, estos hallazgos demuestran que el perfil de síntesis y liberación de citoquinas por parte del MC varía según el tejido en el que asiente, sugiriendo también funciones biológicas diferentes para cada subtipo de MC. Además, el MC es capaz de modificar la expresión de determinadas moléculas de forma reversible de acuerdo a factores ambientales e infecciosos (57), lo cual constituye un mecanismo adaptativo de la respuesta inmune.

1.1.3. CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS DEL MASTOCITO

Desde el punto de vista inmunofenotípico, el MC normal presenta diferentes perfiles antigénicos dependiendo del estadio de maduración y del tejido en el que se encuentra. Diferentes modelos de diferenciación *in vitro* han demostrado que el MC deriva de células precursoras hematopoyéticas pluripotentes, muy poco representadas en MO normal y que típicamente expresan CD34, CD45, CD117, CD116, CD38, CD13, CD33 (Siglec-3), CD123 y en menor medida CD203c (4,6,58). Por el contrario, la expresión de moléculas asociadas a formas más maduras del MC como CD327 (Siglec-6), CD329 (Siglec-8), FcεRI y proteasas y mediadores intracitoplasmáticos como CPA, triptasa, quimasa o histamina, está ausente de forma característica en dichos precursores (6,59,60).

A medida que maduran, los precursores del MC van perdiendo la expresión de marcadores asociados a los estadios tempranos de diferenciación como los antígenos CD34, CD38, CD123 y CD116, mientras que otros como CD117, CD45, CD33 y CD203c van

adquiriendo una mayor intensidad de expresión que se mantendrá hasta el final de la diferenciación celular (61). Paralelamente a su maduración, el MC comienza a expresar proteínas relacionadas con la respuesta inflamatoria como FcεRI, mediadores citoplasmáticos como CPA, triptasa, quimasa o histamina, integrinas como CD49b y CD49c, y moléculas inmunomoduladoras como Siglec-6 y Siglec-8 (6,59,60). En contraposición con estos marcadores, determinados antígenos se expresan de manera relativamente constante durante todas las fases de maduración a MC como CD58, CD63, CD147, CD151, CD172a, CD182 y CD184 (61).

Por último, durante la fase final de la diferenciación celular que se produce ya en los tejidos periféricos, el MC adquiere expresión de una serie de proteínas funcionales relacionadas con la activación mastocitaria como CD69 (62) y HLA-DR (63); en paralelo, el MC incrementa la expresión de otras moléculas que ya estaban presentes en estadios previos de diferenciación como CD63, CD84 y CD203c (51,61).

Aunque en condiciones normales el MC representa tan solo una pequeña proporción de todas las células nucleadas de MO, hoy resulta relativamente fácil identificar y enumerar los MCs de MO mediante citometría de flujo multiparamétrica (50–52,64,65). Según sus características antigénicas, la práctica totalidad de los MCs que se encuentran en la MO en condiciones normales son MCs maduros, en reposo, que típicamente expresan con alta intensidad los antígenos CD117, CD203c y FcεRI, aunque ninguno de ellos es específico de línea mastocitaria. Por ejemplo, CD117 es expresado también por precursores hematopoyéticos, células *natural killer* CD56+, algunas células plasmáticas y células tumorales no hematopoyéticas (revisado en la referencia (51)), mientras que tanto CD203c como FcεRI son moléculas expresadas de forma sistemática también por los basófilos (9,66). Por este motivo, la identificación de MCs por citometría de flujo requiere el uso de una combinación racional de anticuerpos monoclonales dirigidos contra diferentes antígenos; así, la expresión de CD117, CD203c, FcεRI, CD45 y CD33, junto a la ausencia de expresión de CD34, CD38 y CD138 constituye un perfil antigénico único asociado al MC maduro que permite su identificación y distinción de otros tipos celulares de MO.

1.1.4. ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DEL RECEPTOR KIT

El receptor del SCF, denominado Kit, constituye uno de los receptores más relevantes del MC. Aunque Kit también está presente en precursores hematopoyéticos, células de Cajal, melanocitos y células germinales (67–71), en ninguna de estas células alcanza los niveles elevados de expresión observados en el MC. La trascendencia de Kit y los procesos que regula quedan patentes en experimentos con ratones genéticamente deficientes tanto en el gen que codifica el receptor Kit (*KIT*) como en SCF, los cuales carecen de MCs maduros y además presentan anemia hipoplásica, hipopigmentación y esterilidad (72,73). A diferencia de otros receptores expresados por los MCs y cuya función está asociada habitualmente a los estadios más avanzados de diferenciación, el receptor Kit desempeña su función durante todas las etapas del desarrollo del MC, interviniendo de modo crucial en su proliferación, diferenciación, migración y supervivencia (74–77).

Desde el punto de vista bioquímico, el receptor Kit (CD117) es una glicoproteína transmembrana perteneciente a la familia de los receptores tirosina-quinasa (TK) tipo III codificada por el gen *KIT*, localizado en la región pericentromérica del brazo largo del cromosoma 4 (4q11-q12) (78,79). Aunque Kit también se expresa en otras células distintas del MC, la expresión inmunofenotípica en los MCs es de alta intensidad, lo cual permite identificar fácilmente al MC de MO mediante citometría de flujo, y diferenciarlo de células precursoras hematopoyéticas Kit⁺ (50–52,64,65). El receptor Kit consta de 976 aminoácidos distribuidos en 21 exones, con un peso molecular de 145 kD (80) (**FIGURA 2**). Estructuralmente se compone de cinco regiones que guardan una gran similitud con otras proteínas de la misma familia TK, como el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR, abreviado del inglés: “*platelet-derived growth factor receptor*”). La región extracelular de Kit está constituida por cinco dominios tipo inmunoglobulina y es la región de la molécula a la que se une SCF para inducir dimerización del receptor (81,82). El fragmento transmembrana sirve de unión entre la porción extracelular y la región intracelular, la cual se compone de una región yuxtamembrana y de dos dominios TK que incluyen un sitio de unión para ATP (dominio TK1) y una región fosfotransferasa (dominio TK2), separadas por un inserto-quinasa. La actividad catalítica de Kit reside en los domi-

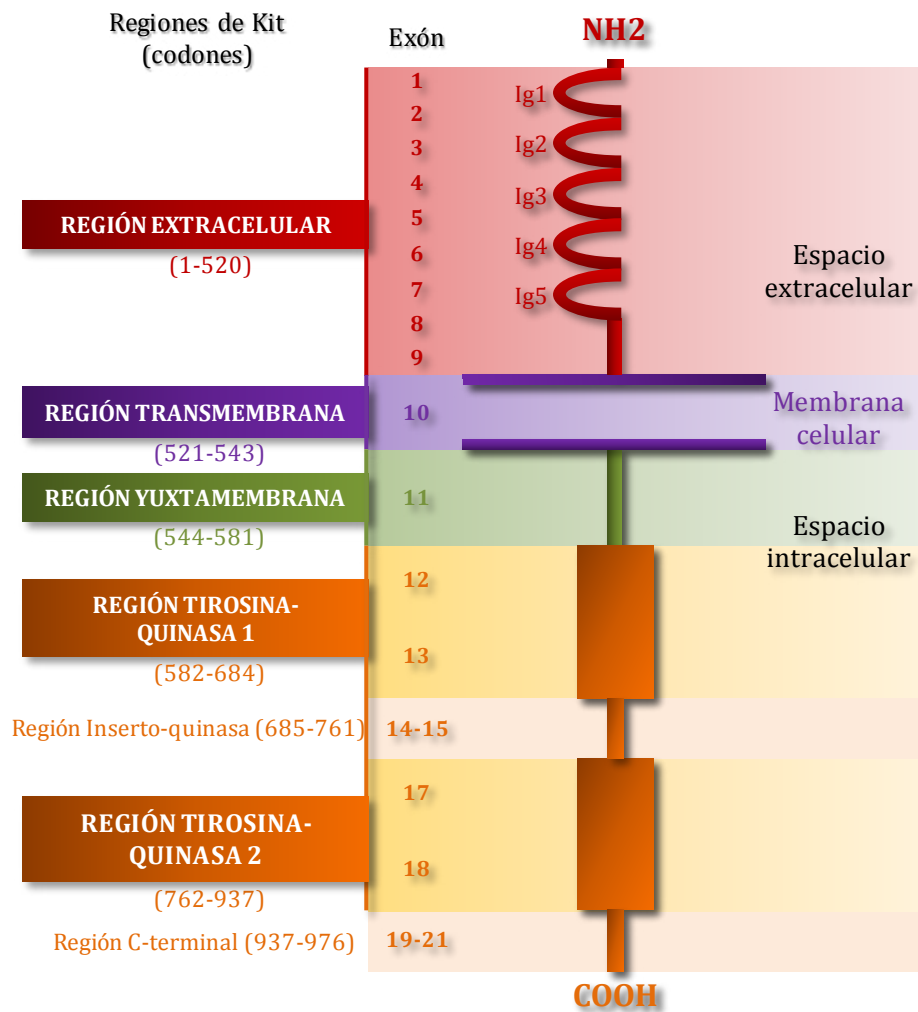


FIGURA 2. Estructura del receptor Kit.

Ig, dominio tipo inmunoglobulina; NH₂, extremo aminoterminal; COOH, extremo carboxiterminal.

nios TK y está directamente relacionada con la fosforilación de proteínas a partir de grupos fosfato obtenidos del ATP; a su vez, la región yuxtamembrana cumple una función reguladora del receptor inhibiendo su actividad en ausencia de SCF (83,84).

SCF es una glicoproteína codificada en el cromosoma 12q22-q24 (85) expresada por células estromales, fibroblastos y células endoteliales (71). Actualmente se reconocen dos isoformas biológicamente activas de SCF: una forma transmembrana (mSCF) y otra soluble (sSCF), que se produce como consecuencia de mecanismos de corte y empalme (*splicing*) alternativos del mismo transcrito primario de ARN, de manera que el sSCF contiene un sitio de escisión proteolítica en el exón 6 que queda excluido en el mSCF durante el proceso de *splicing* (85).

La interacción de SCF con Kit desempeña un papel crucial en la biología del MC. Dicha interacción resulta de una unión no covalente de homodímeros de SCF a los dominios tipo inmunoglobulina de la región extracelular de Kit, lo cual induce la dimerización del receptor (76,86,87). Como consecuencia de ello, se estimula la actividad TK de la región intracelular de Kit, que cataliza la fosforilación de residuos de tirosina del receptor a partir de grupos fosfato obtenidos del ATP unidos al mismo (88). Dichos residuos de tirosina, una vez fosforilados, forman puntos de anclaje para diversas proteínas que contienen dominios análogos a los de la oncoproteína *Src* (dominios tipo Src con homología tipo 2 o SHC, abreviado del inglés: “*Src-homology 2 domains*”). La unión de dichas proteínas genera señales de activación a través de diferentes vías de señalización intracelular, incluidas las vías de Ras/ERK (abreviado del inglés: “*rat sarcoma/extracellular signal-regulated kinases*”), JAK/STAT (abreviado del inglés: “*Janus kinase/signal transducers and activators of transcription*”) (89–93), fosfatidil inositol trifosfato quinasa (PI3K) (94–96) y diversas quinasas de la familia *Src* (97,98). Estas vías de señalización conducen a la activación de factores de transcripción y a la síntesis de proteínas que intervienen en la modulación de la proliferación, diferenciación, migración, adhesión, secreción y supervivencia del MC (revisado en la referencia (99)).

Dada la trascendencia que tienen los procesos celulares en los que interviene la activación de Kit, en condiciones normales existen férreos mecanismos de regulación que tienen por objeto evitar la activación desmesurada del receptor y garantizar una mastopoyesis controlada. Uno de estos mecanismos de regulación es la monoubiquitinización de Kit por la acción de enzimas ubiquitin ligasas, que se produce inmediatamente tras la unión del SCF y cuya consecuencia es la internalización del receptor y su posterior degradación en los lisosomas (100–102). Por otro lado, diversas moléculas activadas durante el proceso de transducción de la señal intracelular generada tras la interacción SCF/Kit, como la tirosina fosfatasa SHP-1 (abreviado del inglés: “*Src-homology región 2 domain containing phosphatase-1*”), la proteína quinasa C (PKC) o la molécula supresora de la señalización de citoquinas SOCS-1 (abreviado del inglés: “*supresor of cytokine signaling 1*”), intervienen también en la regulación del proceso. Así, la proteína SHP-1 cataliza la desfosforilación

de Kit mediante la interacción con un residuo de tirosina localizado en el dominio yuxta-membrana modulando negativamente la actividad del receptor (103). Por su parte, la PKC una vez activada por el diacilglicerol (DAG) generado a partir de ácido fosfatídico por la acción de la fosfolipasa D, que a su vez es activada por la PI3K, favorece la fosforilación de residuos específicos de serina en la región inserto-quinasa de Kit, inhibiendo así su actividad (104). Por el contrario, la acción reguladora de SOCS-1 tiene lugar mediante la supresión selectiva de la mitogénesis inducida por Kit (105).

1.1.5. MECANISMOS DE ACTIVACIÓN MASTOCITARIA

El MC expresa una gran variedad de receptores de membrana que están implicados en la respuesta inmune tanto innata como adquirida. De ellos, merece destacar el FcεRI, los TLR, los CR (CR1-5) y los receptores para IgG FcγRI (CD64) y FcγRII (CD32). Además, el MC puede activarse por neuropéptidos, citoquinas, quimiocinas y otras sustancias inflamatorias (revisado en la referencia (106)), y por estímulos físicos como la presión o el calor (107).

El mecanismo de activación mastocitaria más conocido es el que se produce en las reacciones alérgicas de hipersensibilidad tipo I, que se desencadenan tras la interacción de un determinado antígeno (p.ej., alérgeno) con un anticuerpo de tipo IgE específico del mismo y unido previamente al receptor FcεRI presente en la membrana del MC. El FcεRI también se expresa en los basófilos y en menor medida, en células de Langerhans, en una subpoblación de monocitos y en los granulocitos eosinófilos. Estructuralmente, FcεRI está formado por un tetrámero constituido por: 1) una cadena α cuyo dominio extracelular constituye el sitio de unión a la IgE, 2) una cadena β que aumenta la estabilidad de la unión y amplifica la transducción de la señal al interior de la célula, y 3) un homodímero de cadenas γ, implicado en la conducción de la señal al interior de la célula (27,108). El proceso de señalización intracelular es necesario para la activación y la consecuente respuesta efectora del MC, y depende de la fosforilación de inmunoreceptores con secuencias de activación basadas en tirosina (ITAMs, abreviado del inglés: “*immunoreceptor tyrosin-based activation motifs*”), presentes tanto en la cadena β como en las cadenas γ del

FcεRI (revisado en la referencia (109)). Dicha fosforilación de los dominios ITAMs de FcεRI se produce de forma secuencial mediante la acción, inicialmente, de una proteína con actividad TK de la familia *Src* adyacente al receptor FcεRI denominada *Lyn*, que fosforila la subunidad β. La fosforilación de la cadena β promueve la subsiguiente fosforilación de la subunidad γ, la cual a su vez, favorece la activación de una TK de la familia ZAP-70 denominada *Syk*, capaz de fosforilar distintos sustratos, incluidos la proteína adaptadora LAT (abreviado del inglés: “*linker for activation of T cells*”), SLP-76, Vav y la fosfolipasa Cγ (PLCγ). En su conjunto, estas moléculas una vez activadas, determinan el inicio de una serie de estímulos intracelulares esenciales para la liberación de mediadores acumulados en el interior de los gránulos citoplasmáticos del MC, la síntesis de citoquinas y la activación de fosfolipasa A2 (PLA2), con la generación de ácido araquidónico (AA) a partir de los fosfolípidos de la membrana celular. El proceso de activación se complementa mediante la fosforilación de la proteína adaptadora *Gab2* merced a la acción de otra TK de la familia *Src* denominada *Fyn*. La fosforilación de *Gab2* promueve la generación de fosfatidil inositol trifosfato (PIP₃), el cual a su vez favorece la atracción hacia la membrana de moléculas como Btk y PLCγ, esenciales para el aumento del calcio intracelular y el proceso de la desgranulación (110).

Paralelamente a este proceso de señalización multimolecular que favorece la desgranulación del MC, se produce la activación de varias moléculas que tienen una acción fundamentalmente inhibidora de la señal intracelular, y cuya función es evitar una respuesta excesiva o inapropiada. Entre estas moléculas destacan receptores que contienen secuencias de inhibición basadas en tirosina (ITIMs, abreviado del inglés: “*immunoreceptor tyrosin-based inhibition motifs*”) (111) y promueven la acción de moléculas desfosforiladoras como SHP-1, SHP-2 o SHIP, y de la proteína adaptadora NTAL (abreviado del inglés: “*non-T cell activation linker*”), que es activada, junto a LAT, tras la estimulación del FcεRI. Aunque sigue sin conocerse su mecanismo preciso de acción, se cree que NTAL podría tener una acción fundamentalmente inhibitoria, como demuestra el aumento de la actividad secretora de los MCs que se produce en ratones genéticamente deficientes en NTAL (112). Además de las vías de activación e inhibición intracelular descritas, la interacción de

diversas moléculas con propiedades mixtas (activadoras e inhibidoras) pone de manifiesto la gran complejidad de los mecanismos implicados en la regulación del proceso de señalización que se produce como consecuencia de la estimulación de FcεRI en las reacciones alérgicas mediadas por IgE.

1.1.6. MEDIADORES MASTOCITARIOS

La consecuencia final de los procesos de activación mastocitaria es la liberación al medio extracelular de una gran variedad de sustancias proinflamatorias y vasoactivas, entre las que se incluyen mediadores almacenados de manera constitutiva en el interior de los gránulos citoplasmáticos del MC (mediadores mastocitarios primarios), mediadores sintetizados *de novo* tras la activación del MC (mediadores mastocitarios secundarios) y diversas citoquinas (revisado en las referencias (113,114)) (**FIGURA 3**), que dan lugar a diferentes manifestaciones clínicas (**TABLA 1**).

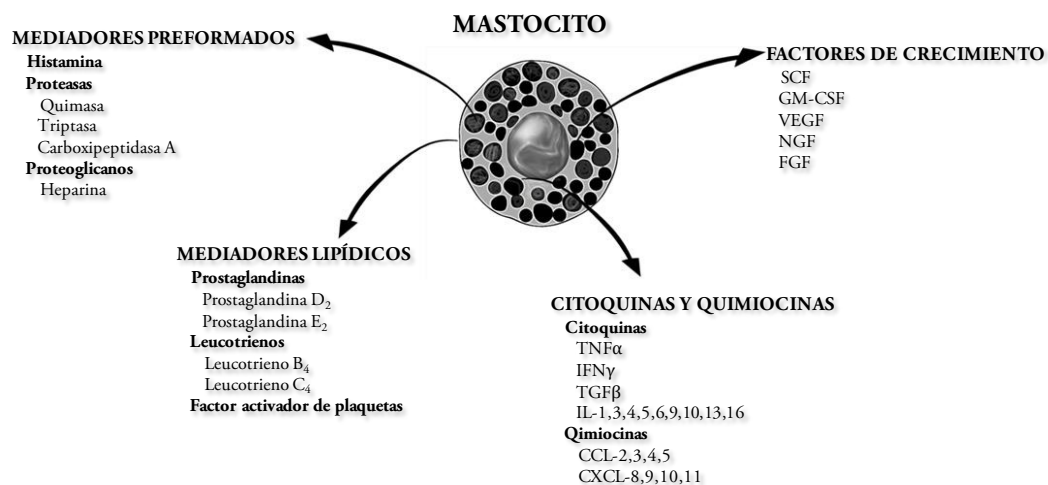


FIGURA 3. Principales mediadores secretados por el mastocito.

SCF, factor de crecimiento de células progenitoras (*stem cell factor*); GM-CSF, factor estimulante de colonias granulomonocíticas (*granulocyte-monocytic colony-stimulating factor*); VEGF, factor de crecimiento vasculo-endotelial (*vascular endothelial growth factor*); NGF, factor de crecimiento nervioso (*nerve growth factor*); FGF, factor de crecimiento de fibroblastos (*fibroblast growth factor*); TNFα, factor de necrosis tumoral alfa (*tumor necrosis factor alpha*); IFNγ, interferón gamma; TGFβ, factor de crecimiento transformante beta (*transforming growth factor beta*); IL, interleuquina, CCL, ligando de quimiocina CC (*chemokine CC motifs ligand*); CXCL, ligando de quimiocina CXC (*chemokine CXC motifs ligand*).

TABLA 1. Efectos clínicos de los principales mediadores secretados por el mastocito.

TIPO DE MEDIADOR	MEDIADOR	MANIFESTACIONES CLÍNICAS ASOCIADAS
MEDIADORES PREFORMADOS	HISTAMINA	Cefalea, hipotensión, prurito, urticaria, angioedema, diarrea, dolor, broncoconstricción, arritmias cardíacas, IAM, hipersecreción gástrica
	QUIMASA	Arritmias cardíacas, IAM, HTA
	TRIPTASA	Diátesis hemorrágica, inflamación
	HEPARINA	Diátesis hemorrágica
MEDIADORES LIPÍDICOS	PGD ₂	<i>Flushing</i> , secreción de moco, broncoconstricción, inestabilidad vascular, cefalea, náuseas, dolor abdominal, síntomas neuropsiquiátricos
	LTC ₄ , LTD ₄ y LTE ₄	Secreción de moco, broncoconstricción, inestabilidad vascular
	PAF	Dolor abdominal, arritmias cardíacas, IAM, urticaria, edema pulmonar, hipotensión, CID, nefritis, úlcera gastrointestinal
CITOQUINAS	IL-1 β , IL-6 y TNF α	Síndrome constitucional, osteoporosis, fiebre

Adaptado de la referencia (115).

PGD₂, prostaglandina D₂; LTC₄, leucotrieno C₄; LTD₄, leucotrieno D₄; LTE₄, leucotrieno E₄; PAF, factor activador de plaquetas; IL-1 β , interleuquina 1 β ; IL-6, interleuquina 6; TNF α , factor de necrosis tumoral α ; IAM, infarto agudo de miocardio; HTA, hipertensión arterial; CID, coagulación intravascular diseminada.

La liberación de los mediadores preformados ocurre en la fase precoz de la inflamación y se produce pocos segundos o minutos después del contacto con el antígeno. Entre estos mediadores preformados merece destacar aminas biógenas como la histamina y la serotonina, proteasas como la triptasa, CPA o quimasa, proteoglicanos como la heparina y el condroitin sulfato y citoquinas inflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α , abreviado del inglés: “*tumoral necrosis factor-alpha*”). Posteriormente, se produce la síntesis y liberación de diversos mediadores originados a partir de fosfolípidos de membrana, fundamentalmente prostaglandinas (PGs), leucotrienos (LTs) y el factor activador de plaquetas (PAF, abreviado del inglés: “*platelet-activating factor*”), así como una gran variedad de citoquinas y quimiocinas que facilitan la activación y reclutamiento de otras

células del sistema inmune, dando lugar a la fase tardía de la reacción, que típicamente se desarrolla entre 2 y 6 horas tras la exposición al alérgeno.

1.1.6.1. HISTAMINA

El mediador vasoactivo más importante de los MCs humanos es la histamina. Gracias a su bajo peso molecular, la histamina posee una gran capacidad de difusión una vez secretada, ejerciendo diferentes funciones biológicas al unirse a receptores específicos (H1, H2, H3 y H4).

Entre los efectos más relevantes de la histamina merece destacar la contracción del músculo liso, vasodilatación, aumento de la permeabilidad vascular, la estimulación de las terminaciones nerviosas y el incremento en la secreción glandular (115,116). No obstante, cabe resaltar que la metabolización de la histamina se produce rápidamente por metilación u oxidación dando lugar a los metabolitos N-metil histamina y ácido imidazolacético que son eliminados por la orina.

1.1.6.2. PROTEASAS NEUTRAS

La mayor parte del contenido proteico de los gránulos del MC está constituido por proteasas neutras que poseen actividad hidrolítica de proteínas presentes en las superficies celulares de los tejidos, proteínas de la matriz extracelular, formas inactivas de proenzimas y otros mediadores proinflamatorios de naturaleza peptídica; todo ello contribuye a generar y amplificar el daño tisular que ocurre tras la desgranulación mastocitaria. Por otro lado, estas proteasas pueden participar también en la regulación de procesos asociados a la inflamación, gracias a su capacidad de activar enzimáticamente diferentes proteínas con efecto inhibitor sobre la inflamación, y de inhibir otras con actividad proinflamatoria, confiriéndoles también un rol antiinflamatorio.

La proteasa más abundante en el MC es la triptasa, que se almacena en sus gránulos (y en menor medida también en los de los basófilos) en forma de tetrámeros que forman complejos con la heparina (117,118). En el suero pueden encontrarse dos isoformas de

triptasa: 1) la α -triptasa, secretada constitutivamente por el MC en forma enzimáticamente inactiva; y 2) la β -triptasa, liberada al medio en grandes cantidades durante el proceso de desgranulación mastocitaria. Actualmente existe un inmunoensayo que determina los niveles de triptasa sérica total, es decir, la suma de α y β triptasa, sin discriminar entre ambas isoformas. Así, los niveles elevados de triptasa sérica total que se observan con frecuencia en pacientes con mastocitosis son el resultado de una liberación crónica incrementada de α -triptasa, como consecuencia de una carga mastocitaria total superior a lo normal (119–121); por el contrario, el aumento de los niveles de triptasa total detectadas en el suero de pacientes con anafilaxia suele reflejar la liberación aguda de β -triptasa que ocurre tras la desgranulación mastocitaria (117,122). Cabe señalar que pese a esta dualidad, la medición de los niveles de triptasa sérica total ha demostrado ser de mayor utilidad que la de otros mediadores mastocitarios como la histamina plasmática o sus metabolitos en orina, tanto para el diagnóstico de anafilaxia como de mastocitosis (123). La mayor rentabilidad diagnóstica de la determinación de triptasa sérica se debe a su mayor especificidad, la sencillez y rapidez de la técnica de medición disponible, y un perfil de degradación metabólica más lento que permite su análisis hasta 6 horas después de ser liberada, sin que interfieran en los resultados factores como la ingesta de alimentos con alto contenido en histamina. Entre los principales efectos biológicos de la triptasa destacan la contracción del músculo liso (124), la degradación de neuropéptidos (125,126), la activación de colagenasa (127), la proliferación de fibroblastos (128,129), la generación de C3a (130) y bradiquinina (131) y la inactivación del fibrinógeno (132). Además la triptasa es capaz de promover el reclutamiento de otras células del sistema inmune (133,134), participa activamente en fenómenos de remodelado tisular (135) y angiogénesis (136), y ejerce una función protectora del potencial efecto nocivo de algunas sustancias liberadas durante el proceso de inflamación como son la neurotensina y la endotelina (137).

Otras proteínas mastocitarias con actividad enzimática son la quimasa y la CPA, que se almacenan en los gránulos formando complejos macromoleculares con proteoglicanos. El principal efecto de la liberación de quimasa es la generación de angiotensina II mediante hidrólisis peptídica de la angiotensina I (138–140), mecanismo que podría estar

implicado en el desarrollo de los signos y síntomas de carácter vasoconstrictor que se observan en algunos pacientes con patologías relacionadas con la disfunción mastocitaria. Además, la quimasa induce hipersecreción mucosa, degradación de la matriz extracelular mediante el clivaje de proteínas como la fibronectina y el colágeno, la activación de metaloproteasas *in situ* en las placas ateroscleróticas y del factor de crecimiento TGF- β , e inducción de apoptosis en las células del músculo liso de los vasos sanguíneos (141–143). Por su parte, la CPA tiene efectos menos conocidos, aunque se le ha atribuido un papel importante en la inmunidad innata, por su capacidad de hidrolizar determinadas toxinas y productos nocivos generados durante la respuesta inflamatoria como la neurotensina o la endotelina-1 (144).

1.1.6.3. PROTEOGLICANOS

La principal función de los proteoglicanos presentes en los gránulos del MC, como la heparina y el sulfato de condroitina, es la de formar complejos estables con otros mediadores mastocitarios y permitir así su almacenamiento y transporte a través de los vasos linfáticos (145). Además, los proteoglicanos se han implicado en la regulación de la actividad enzimática de las proteasas mastocitarias, y se les ha atribuido una función pro-apoptótica (revisado en la referencia (146)).

1.1.6.4. MEDIADORES LIPÍDICOS

Además de la secreción de sustancias preformadas y almacenadas en los gránulos mastocitarios, la activación del MC induce la síntesis y posterior liberación de mediadores proinflamatorios de naturaleza lipídica como los eicosanoides y el PAF. Este proceso se inicia con la activación de la PLA2 que condiciona la generación de AA y lisofosfatidilcolina a partir de los fosfolípidos presentes en la membrana del MC (147,148). El AA generado puede seguir dos vías metabólicas distintas: 1) una a través de la enzima ciclo-oxigenasa (COX) que determina la producción de PGs, y 2) otra en la que se generan LTs

gracias a la acción de la enzima lipo-oxigenasa (LO) (149). Por su parte, el PAF se origina por la acción de una acetil transferasa sobre la lisofosfatidilcolina (150).

La principal PG generada por el MC activado es la PGD₂, que tiene un potente efecto vasodilatador, aumenta la permeabilidad vascular (151) y favorece la quimiotaxis de eosinófilos (152,153). A nivel del tracto respiratorio, la PGD₂ posee además propiedades broncoconstrictoras (154). La acción de la enzima LO sobre el AA origina LTA₄ que puede metabolizarse, bien a LTB₄ mediante un proceso de hidroxilación, o bien a los denominados cisteinil-LTs (LTC₄, LTD₄ y LTE₄), que se producen de manera secuencial mediante la acción de diferentes enzimas (155). El principal efecto biológico del LTB₄ es la quimiotaxis de neutrófilos, mientras que los cisteinil-LTs, especialmente el LTC₄ y el LTD₄ producen contracción de la musculatura lisa, broncoconstricción, aumento de la permeabilidad capilar y secreción de moco (revisado en la referencia (156)). Por su parte, el PAF es un potente mediador capaz de actuar a concentraciones muy bajas; no obstante, tiene una vida media corta de apenas unos pocos minutos una vez liberado por el MC, al ser inactivado por una acetil hidrolasa presente en el plasma y en numerosos tejidos (157). A pesar de esto, PAF es capaz de producir un amplio abanico de efectos mediados por su unión a receptores específicos, entre los que merece destacar: broncoconstricción, secreción de moco, vasodilatación, aumento de la permeabilidad vascular y agregación plaquetaria (158,159). Además de estos efectos directos, PAF interviene de forma indirecta en la respuesta inflamatoria propiamente dicha, mediante la activación y la quimiotaxis de leucocitos, y la inducción de la liberación de otros mediadores por parte del MC y de la plaqueta como la histamina, y tromboxanos y serotonina, respectivamente (160).

1.1.6.5. CITOQUINAS Y QUIMIOCINAS

Al igual que otras células del sistema inmune, el MC produce una gran variedad de citoquinas y quimiocinas que son sintetizadas *de novo* y liberadas al medio extracelular tras la activación mastocitaria, participando activamente en el mantenimiento del proceso inflamatorio mediante el reclutamiento de otras células del sistema inmune como linfocitos, neutrófilos o eosinófilos, y la inducción de la expresión de moléculas de adhesión

en las mismas y en las células endoteliales. Entre las citoquinas producidas por el MC merece destacar el TNF- α , la IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-12, IL-13, IL-15, IL-16, IL-18, el factor estimulante de colonias granulo-monocíticas (GM-CSF, abreviado del inglés: *granulocyte-monocytic colony-stimulating factor*), el interferón (IFN)- α , IFN- β e IFN- γ , y las quimiocinas CCL2, CCL3, CCL4, CCL5 y CXCL8 (14,113,161). Otras moléculas sintetizadas y liberadas por el MC como TGF- β e IL-10 intervienen en la regulación del proceso mediante una acción fundamentalmente anti-inflamatoria (162,163). De todas estas citoquinas, TNF- α constituye la citoquina más abundante de todas las secretadas por el MC y tiene la particularidad de que, además de sintetizarse *de novo* tras la activación mastocitaria, también se encuentra preformada en pequeñas cantidades en el interior del MC, siendo liberada de manera inmediata junto con los otros mediadores preformados durante la exocitosis de los gránulos mastocitarios. Por otro lado, TNF- α induce la expresión de moléculas de adhesión en las células endoteliales y de integrinas en los leucocitos, facilitando la unión entre ambos grupos de células, y además estimula la liberación de quimiocinas, facilitando así la infiltración leucocitaria local en el lugar donde se ha puesto en marcha la respuesta inflamatoria (revisado en la referencia (164)).

1.2. MASTOCITOSIS

El término mastocitosis engloba un grupo heterogéneo de enfermedades caracterizadas por la presencia de MCs clonales en uno o más órganos y tejidos, entre los que destacan la piel y la MO. La heterogeneidad de la mastocitosis está determinada en gran medida por la existencia de diferentes formas clínicas de la enfermedad en función de los órganos y tejidos afectados. Así, la clasificación actual de la Organización Mundial de la Salud (OMS) distingue nueve subtipos distintos de mastocitosis (165,166) (**TABLA 2**) que pueden ser agrupados en tres grandes formas clínicas: 1) mastocitosis cutánea (CM; abreviado del inglés: *“cutaneous mastocytosis”*), definida por la presencia de MCs patológicos en la piel, sin afectación de MO, 2) mastocitosis sistémica (SM; abreviado del inglés: *“systemic mastocytosis”*), caracterizada por la presencia de MCs patológicos en MO, habitualmente

asociada a afectación de otros órganos, y 3) sarcoma de mastocitos (MCS, abreviado del inglés: “*mast cell sarcoma*”).

TABLA 2. Clasificación de la OMS (OMS 2016) de la mastocitosis.

I. MASTOCITOSIS CUTÁNEA (CM)
CM maculopapular (MPCM)
CM difusa (DCM)
Mastocitoma cutáneo
II. MASTOCITOSIS SISTÉMICA (SM)
Mastocitosis sistémica indolente (ISM)
Mastocitosis sistémica quiescente (SSM)
Mastocitosis sistémica agresiva (ASM)
Mastocitosis sistémica asociada a otra hemopatía clonal de línea no mastocitaria (SM-AHNMD o SM-AHN)
Leucemia de mastocitos (MCL)
III. SARCOMA DE MASTOCITOS (MCS)

Adaptado de las referencias (165,166)
OMS, Organización Mundial de la Salud.

Dentro de cada subtipo de mastocitosis existe además una gran variabilidad de unos pacientes a otros en cuanto a la expresión clínica de la enfermedad como es la existencia de SM con o sin afectación cutánea asociada, el tipo y la extensión de la afectación cutánea cuando ésta existe, o el gran abanico de síntomas relacionados con la liberación de mediadores mastocitarios que pueden experimentar los pacientes, y que varían desde el simple enrojecimiento de las lesiones cutáneas o el prurito, hasta cuadros de hipotensión severa con colapso vascular y riesgo de muerte. Otro factor determinante de la gran heterogeneidad de la mastocitosis, y que condiciona en gran medida su evolución, es la edad de aparición de la enfermedad, existiendo casos de inicio pediátrico y casos de inicio en edad adulta. Así, mientras que en niños la enfermedad suele estar limitada a la piel y tiende a la regresión espontánea en un porcentaje sustancial de ellos alrededor de la pubertad (167–174), la mastocitosis de inicio en edad adulta se considera una enfermedad crónica e incurable, en la que la afectación sistémica es la norma (175).

Desde el punto de vista pronóstico, se distinguen dos grandes grupos de mastocitosis: 1) formas avanzadas asociadas a una marcada infiltración tisular o a otra hemopatía clonal potencialmente maligna, que suelen ocasionar una alteración funcional de los órganos afectados y condicionar la supervivencia del individuo, y 2) formas indolentes en las que el índice de proliferación del MC y su acumulación en los tejidos es baja, asociadas a tasas de supervivencia global similares a las de la población general.

Las formas indolentes de mastocitosis están representadas por la CM y la SM indolente (ISM, abreviado del inglés: *“indolent systemic mastocytosis”*), que en general no suelen afectar la esperanza de vida del individuo. A su vez, las formas avanzadas de mastocitosis incluyen la SM agresiva (ASM, abreviado del inglés: *“aggressive systemic mastocytosis”*), la SM asociada a otra hemopatía clonal de línea no mastocitaria (SM-AHNMD o AHN, abreviado del inglés: *“systemic mastocytosis with an associated haematological clonal non-mast cell lineage disease”* o *“systemic mastocytosis with an associated haematological neoplasm”*), la leucemia de MCs (MCL, abreviado del inglés: *“mast cell leukemia”*) y el MCS, asociadas todas ellas a elevada morbimortalidad y mal pronóstico. A pesar de ello, existe también una gran heterogeneidad en el comportamiento clínico de la enfermedad tanto en formas asociadas a mal pronóstico como en las de buen pronóstico, existiendo casos con carga mastocitaria elevada que permanecen estables durante largos períodos de tiempo y, a la inversa, pacientes con una baja carga tumoral al diagnóstico que pueden evolucionar a formas agresivas de la enfermedad.

La gran heterogeneidad clínica de la mastocitosis contrasta con la presencia en la mayor parte de los casos de alteraciones fisiopatológicas comunes, independientemente del subtipo de mastocitosis, y que constituyen algunos de los criterios diagnósticos de la enfermedad. Entre estas alteraciones destaca la presencia de mutaciones activantes del oncogén *KIT*, que determinan un estado de activación permanente del receptor Kit independientemente de su unión a SCF, y que están presentes en la gran mayoría (>95%) de las SM del adulto (176–179) y en un elevado porcentaje de las mastocitosis pediátricas (180). La mayoría de las mutaciones de *KIT* asociadas a SM suelen ser mutaciones somáticas que generalmente afectan al dominio catalítico de la molécula, siendo la más frecuente

la mutación D816V, que ocasiona un cambio del aminoácido aspartato por valina en la posición 816 (Asp816Val) (181). En una pequeña proporción de casos (<5%) es posible detectar mutaciones que determinan cambios de aminoácidos diferentes en el mismo codón 816 de *KIT*, o que afectan a otros codones diferentes al codón 816 (**TABLA 3**). A diferencia de la mutación D816V, algunas de estas mutaciones atípicas de *KIT* son de naturaleza germinal, lo cual está estrechamente relacionado con la agregación familiar de la enfermedad que tiende a ocurrir en estos casos, y otras tienen importantes implicaciones terapéuticas como se discute más adelante en esta introducción.

El estado de hiperactivación de Kit que se produce en la mastocitosis como consecuencia de mutaciones activantes del gen *KIT*, condiciona una alteración funcional del receptor Kit que conduce a una desregulación del crecimiento, diferenciación y activación de los MCs, y constituye la base de las características clínicas típicas de la enfermedad: la infiltración tisular asociada a agregados de MCs en MO y las lesiones cutáneas, y la hiperreactividad de los MCs tumorales ante estímulos que en condiciones normales no desencadenan su activación, con la consiguiente aparición de síntomas secundarios a la liberación de mediadores mastocitarios (182–184) (**TABLA 1**). Sin embargo, existe también una gran variabilidad en cuanto al perfil clínico de la enfermedad y el grado de expansión celular observados en distintos pacientes. Por ejemplo, existen mastocitosis muy sintomáticas con baja carga mastocitaria y a la inversa, pacientes que presentan una infiltración marcada de órganos por MCs patológicos que apenas sufren síntomas relacionados con su activación, pudiendo detectarse en ambos casos la mutación D816V de *KIT*. Esto indica que la mutación de *KIT* no explica por sí misma el tipo de mastocitosis o su gravedad, y que deben existir otros mecanismos fisiopatológicos o defectos moleculares adicionales que en última instancia determinan el comportamiento clínico concreto de la enfermedad en cada paciente.

TABLA 3. Mutaciones de *KIT* diferentes de la mutación D816V descritas en mastocitosis.

EXÓN	MUTACIÓN	FORMAS CLÍNICAS	NIÑOS/ADULTOS	FAMILIARES	REFERENCIAS
5	Y269C	SM-AHNMD	No/Sí	No	(185)
	del417-419InsY	CM	Sí/No	No	(180,186)
8	del417-419InsNA	CM	Sí/No	No	(186)
	del417-419InsI	CM	Sí/No	No	(186)
	delD419	CM,ISM,MCS	Sí/Sí	Sí	(180,186-189)
	InsFF419	CM	Sí/No	No	(180)
	C443Y	CM	Sí/No	No	(180,186)
	S451C	CM	Sí/Sí	Sí	(186,190)
	S476I	CM,MCL	Sí/Sí	No	(180,191,192)
9	dup501-502	CM,MCL	Sí/Sí	No	(180,193)
	dup502-503	CM,MCL*	Sí/Sí	No	(180,194,195)
	Y503_F504InsAY	ASM	No/Sí	No	(185)
	dup505-508	CM	Sí/No	No	(180)
	K509I	CM,ISM*,ASM*,MCL*	Sí/Sí	Sí	(180,189,196-198)
10	F522C	ASM*	No/Sí	No	(199)
	V530I	SM-AHNMD	No/Sí	No	(19)
	A533D	CM,ISM	Sí/Sí	Sí	(200)
	M541L	CM,ISM	Sí/Sí	Sí	(180,200-202)
11	V559A	CM	Sí/No	No	(203)
	V559I	ASM	No/Sí	No	(204)
	V560G	CM,ISM,MCL,MCS	No/Sí	No	(182,185,189,193,205-207)
	D572A	CM	Sí/No	No	(180)
13	R634W	CM	Sí/No	Sí	(208)
	K642E	ASM	No/Sí	No	(185)
	V654A	MCL	No/Sí	No	(209)
	L799F	MCS	No/Sí	No	(210)
17	R815K	CM	Sí/No	No	(211)
	insV815_I816	ISM	No/Sí	No	(176)
	D816A	SM-AHNMD	Sí/Sí	No	(212,213)
	D816Y	CM,ISM,SM-AHNMD,MCL	Sí/Sí	No	(176,180,214,215)
	D816I	CM,SM-AHNMD	Sí/Sí	No	(180)
	D816H	ISM,SM-AHNMD,MCL	No/Sí	No	(216,217)
	D816F	CM,ISM	Sí/Sí	No	(214,218)
	D816T	ISM	No/Sí	No	(219)
	I817V	ISM*	No/Sí	No	(176)
	R815K	CM	Sí/No	No	(211)
	L818E	ISM*	No/Sí	No	REMA‡
	D820E	CM	Sí/No	No	REMA‡
	D820G	ASM	No/Sí	No	(220)
	N822I	CM	Sí/Sí	Sí	(221)
	N822Y	ISM*,MCL	Sí/Sí	Sí	REMA‡
18	N822K	CM,SM-AHNMD,MCS	Sí/Sí	No	(222-224)
	M835K	CM	Sí/No	No	(225)
	E839K	CM	Sí/No	No	(214)
	S840N	CM	Sí/No	No	(226)
	S849I	CM	Sí/Sí	Sí	(225)

SM-AHNMD, mastocitosis sistémica asociada a otra hemopatía clonal de línea no mastocitaria; CM, mastocitosis cutánea; ISM, mastocitosis sistémica indolente; MCS, sarcoma de mastocitos; MCL, leucemia de mastocitos; ASM, mastocitosis sistémica agresiva.

■ Mutaciones descritas con carácter germinal.

*Casos compatibles con mastocitosis sistémica bien diferenciada (WDSM).

‡Datos no publicados.

1.2.1. PREVALENCIA DE LA MASTOCITOSIS

Aunque su incidencia y prevalencia siguen sin conocerse con exactitud, la mastocitosis se considera una enfermedad rara que afecta a alrededor de 5-10 de cada 100.000 individuos (227,228). Sin embargo, actualmente asistimos a una clara tendencia al incremento del número de casos diagnosticados, fundamentalmente a expensas de SM que cursan con anafilaxia u otros síntomas relacionados con la liberación de mediadores mastocitarios en ausencia de afectación cutánea (229–231). Esto es debido en gran medida al importante avance que se ha producido en los últimos años en el conocimiento de la enfermedad, y a la disponibilidad de técnicas diagnósticas cada vez más sensibles, capaces de detectar la enfermedad en estadios tempranos de la misma en los que generalmente existe una carga mastocitaria muy baja (177,178,232).

Globalmente, la mastocitosis puede afectar tanto a niños como a adultos y no tiene una predilección clara por ninguno de los dos sexos (228). Aunque se considera una enfermedad no hereditaria, ocasionalmente pueden observarse varios casos en una misma familia, lo que habitualmente está asociado a la presencia de mutaciones germinales localizadas en exones diferentes al exón 17 de *KIT* (187,190,197,208).

1.2.2. MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LA MASTOCITOSIS

Las manifestaciones clínicas asociadas a los diferentes tipos de mastocitosis están relacionadas fundamentalmente con la secreción de mediadores mastocitarios y/o la acumulación de MCs en distintos tejidos. La gran constelación de síntomas y signos asociados a la enfermedad se debe, por un lado, al amplio abanico de mediadores mastocitarios que los MCs son capaces de liberar al medio, y por otra parte, a la presencia de MCs en la práctica totalidad de los órganos y tejidos humanos.

En términos globales, el hallazgo clínico más relevante en la mastocitosis es, por su frecuencia y especificidad, la presencia de lesiones cutáneas. La identificación de una anomalía en la piel y su carácter crónico hacen que los pacientes con mastocitosis en la piel sean derivados o consulten por propia iniciativa con el dermatólogo, quien suele

sospechar la enfermedad con relativa facilidad. El elevado índice de sospecha de mastocitosis en estos casos es debido al aspecto macroscópico característico de las lesiones cutáneas, al menos de las formas más típicas, y a los síntomas que habitualmente asocian como consecuencia de la liberación local de mediadores mastocitarios. En pacientes pediátricos es frecuente que el cuadro de activación local de las lesiones cutáneas desencadene la formación de vesículas o ampollas con contenido líquido, especialmente durante los primeros meses o años de vida (172,173,233). En ocasiones, la aparición recurrente de estos episodios de formación de ampollas obliga a realizar el diagnóstico diferencial con otras enfermedades ampollosas de la infancia como el síndrome de la piel escaldada estafilocócica o la epidermolisis ampollosa, entre otras. Otros síntomas cutáneos que se observan con relativa frecuencia en la mastocitosis son el dermatografismo (172,173,234) y las reacciones locales extensas tras la picadura de insectos, mientras que los episodios de urticaria o angioedema son relativamente infrecuentes (235), incluso en los pacientes que presentan anafilaxia.

El *flushing* (**FIGURA 4**) consiste en un enrojecimiento brusco de la cara y en ocasiones del tercio superior del tórax que, aunque característico, no es específico de la mastocitosis, ocurriendo en alrededor de la mitad de los pacientes. El diagnóstico diferencial del *flushing* incluye la menopausia, la rosácea, el síndrome carcinoide, el feocromocitoma o el carcinoma medular de tiroides, entre otras causas (236,237). Aunque tradicionalmente se considera un signo cutáneo, en realidad el *flushing* refleja la manifestación cutánea del efecto vasodilatador de ciertos mediadores vasoactivos liberados por el MC, como la histamina, sobre los capilares dérmicos (238). Así, el aumento del flujo sanguíneo secundario a la vasodilatación de una vasculatura tan extensa y superficial como la de la dermis facial, condiciona la aparición del tono rojizo en la piel característico del *flushing*. En ocasiones, el *flushing* se acompaña de otros síntomas de afectación cardiovascular como palpitaciones o mareo, en cuyo caso debe sospecharse la afectación de vasos de mayor calibre y alertar del potencial desarrollo de un cuadro de hipotensión franca con colapso vascular. Por este motivo, el *flushing* debe considerarse un signo precoz de afectación del sistema cardiovascular y ser tratado de manera inmediata.



FIGURA 4. Episodio de *flushing* en una niña de 7 meses de edad con mastocitosis nodular.

Hasta un 70% de los pacientes con mastocitosis presentan síntomas gastrointestinales como diarrea, dolor abdominal, vómitos o dispepsia (239), ya sea por el efecto de mediadores liberados por el MC, como la histamina o los LTs, o como consecuencia directa de la infiltración de la mucosa gastrointestinal por MCs, que típicamente afecta al colon, íleon y/o duodeno y, menos frecuentemente, al estómago (240). La presencia de hepatomegalia, esplenomegalia y adenopatías está directamente relacionada con la infiltración mastocitaria y, aunque puede ocurrir en cualquier subtipo de SM, es más frecuente en las formas avanzadas de la enfermedad, en las que no es rara la aparición de disfunción hepática con hipertensión portal y ascitis (241,242).

La anafilaxia es una de las manifestaciones clínicas más características de la mastocitosis, oscilando su frecuencia entre el 22% y el 49% de los adultos, y entre el 6% y el 9% de los niños (243,244). El principal factor de riesgo para el desarrollo de episodios anafilácticos en niños es la presencia de afectación cutánea extensa y de niveles incrementados

de triptasa sérica (244,245), mientras que en adultos existe una relación inversa entre la carga mastocitaria total y el riesgo de anafilaxia (246). De hecho, la anafilaxia es mucho más frecuente en pacientes que no presentan afectación cutánea (229,230,243,244), en los que la propia anafilaxia suele ser la forma de presentación de la enfermedad y el evento que pone en marcha su estudio diagnóstico.

A nivel óseo, la manifestación más común de la mastocitosis es el déficit de masa ósea, que afecta aproximadamente al 20%-50% de los pacientes adultos, pudiendo ocasionar fragilidad ósea y fracturas patológicas (247–249). El principal mecanismo fisiopatológico implicado en la pérdida de masa ósea en pacientes con mastocitosis es la liberación local de mediadores mastocitarios como la histamina, heparina, triptasa, mediadores lipídicos y citoquinas como TNF- α , IL-1 e IL-6 (250–254). Más raramente, y especialmente en formas avanzadas de la enfermedad, se produce osteoesclerosis difusa (247,249,255) o un patrón mixto de osteoesclerosis con osteólisis focal (247,256).

Otras manifestaciones clínicas de la mastocitosis incluyen fatiga, cefalea, dolor músculoesquelético, hiperreactividad bronquial, alteraciones neuropsiquiátricas y déficit cognitivo (257,258).

Algunas de las manifestaciones clínicas relacionadas con la activación de los MCs que aparecen en pacientes con mastocitosis tienen un carácter relativamente crónico, mientras que otras cursan en brotes episódicos, ya sea tras un desencadenante conocido o de forma idiopática. Entre los desencadenantes de activación mastocitaria más frecuentes se encuentran la temperatura, el estrés, determinados fármacos, procedimientos anestésicos o algunos contrastes radiológicos (**TABLA 4**). Dado que muchos de estos síntomas son indistinguibles de los que se observan en los procesos alérgicos, la sospecha clínica de una mastocitosis subyacente puede pasar con frecuencia inadvertida, especialmente en pacientes que no presentan afectación cutánea.

TABLA 4. Factores potencialmente desencadenantes de síntomas en pacientes con mastocitosis.

FACTOR DESENCADENANTE	FRECUENCIA*
AGENTES FÍSICOS	
Calor, frío, cambios de temperatura	Frecuente
Roce o fricción de lesiones cutáneas	Frecuente
Manipulación del tracto gastrointestinal	Excepcional
Endoscopia	Excepcional
Ejercicio	Excepcional
Infecciones y/o síndromes febriles	Excepcional en adultos Frecuente en niños
FACTORES EMOCIONALES	
Estrés, ansiedad, irritabilidad	Frecuente
FÁRMACOS	
Antiinflamatorios no esteroideos (AINEs)	Raro
Opioides	Raro
Procedimientos anestésicos	Raro
Quimioterápicos	Excepcional
Terapias biológicas	Excepcional
CONTRASTES RADIOLÓGICOS	
Contrastes yodados	Excepcional
EXPANSORES DE VOLUMEN	
Coloides	Excepcional
VENENOS	
Himenópteros (avispa, abejas...)	Frecuente
ALIMENTOS	
Queso curado, chocolate, pescado azul, frutos secos, fresa, etc.	Raro
OTROS FACTORES	
Dolor	Raro
Dentición (niños)	Frecuente
Menstruación (mujeres)	Frecuente
Inmunoterapia (himenópteros)	Raro
Vacunas	Raro
Parto	Raro
Bebidas alcohólicas	Raro

Esta tabla hace referencia a factores que pueden inducir desgranulación mastocitaria, lo cual no implica que todas las personas con patología mastocitaria presenten síntomas desencadenados por todos ellos.

*Frecuente, >20% casos; Raro, 1-20% casos; Excepcional, <1% casos (según la experiencia de la REMA).

1.2.3. CLASIFICACIÓN DE LA MASTOCITOSIS

La clasificación actual de tumores del tejido hematopoyético y linfoide de la OMS incluye a la mastocitosis como una entidad propia dentro de las neoplasias mieloides, y

distingue nueve subtipos de la enfermedad agrupados en tres grupos principales, en función de los órganos afectados y sus características clínicas y biológicas: CM, SM y MCS (165,166) (**TABLA 2**).

1.2.3.1. MASTOCITOSIS CUTÁNEA (CM)

La piel es, junto con la MO, el tejido que con mayor frecuencia está afectado en la mastocitosis. El término CM adoptado por la OMS se refiere a la presencia de lesiones cutáneas como consecuencia de la infiltración de la dermis por MCs patológicos, sin evidencia de afectación extracutánea (166,259). Sin embargo, la SM puede presentar también afectación cutánea, con características clínicas e histológicas idénticas a las descritas en la CM.

La clasificación de la OMS distingue tres tipos de CM (166): 1) CM maculopapular (MPCM, abreviado del inglés: “*maculopapular cutaneous mastocytosis*”), 2) CM difusa (DCM, abreviado del inglés: “*diffuse cutaneous mastocytosis*”), y 3) mastocitoma cutáneo. Recientemente, la *European Competence Network on Mastocytosis* (ECNM) ha propuesto algunas modificaciones tanto terminológicas como conceptuales a la propuesta de la OMS (173), con el objetivo de superar ciertas limitaciones que esta clasificación presenta, y que serán discutidas en los apartados correspondientes a cada subtipo de CM. Aunque las tres variantes de CM de la clasificación de la OMS pueden verse tanto en pacientes adultos como en niños, la DCM y el mastocitoma cutáneo son formas que se observan de forma predominante en casos pediátricos (171–173).

Desde el punto de vista clínico, los síntomas más frecuentes de la CM son el picor y/o enrojecimiento de las lesiones cutáneas, generalmente desencadenados por factores que producen la activación y subsiguiente desgranulación de los MCs subyacentes (170–172). En este sentido, un signo considerado patognomónico de la CM es el denominado signo de Darier, una reacción urticariforme con picor, eritema y edema local tras la fricción de las lesiones cutáneas (260–262). Sin embargo, la realización de esta maniobra raramente es necesaria para el diagnóstico de las formas típicas, siendo desaconsejable que se realice sobre lesiones de gran tamaño, debido al riesgo de desencadenar síntomas

a nivel sistémico secundarios a una liberación (potencialmente) masiva de mediadores (173,263). El dermatografismo es también un hallazgo típico de la CM, especialmente de la DCM (172,173,234).

Otra manifestación clínica que ocurre con frecuencia en la CM, especialmente en las formas pediátricas, es la aparición de vesículas o ampollas con contenido líquido seroso en las lesiones cutáneas, como consecuencia última de una activación exagerada de los MCs dérmicos y la liberación masiva de sus mediadores a nivel local (171–173). Prueba de ello es que se han descrito niveles significativamente elevados de triptasa y otros mediadores mastocitarios como ILs y factor de crecimiento vaculo-endotelial (VEGF, abreviado del inglés: “*vascular endothelial growth factor*”) tanto en suero como en el líquido de las ampollas de estos pacientes (238,245). Por este motivo, las variantes de CM con mayor densidad de MCs en las lesiones cutáneas, como la DCM, son las formas que con mayor frecuencia asocian la formación de ampollas que, en cualquier caso, se observan prácticamente de manera exclusiva en pacientes pediátricos, especialmente durante los primeros meses de la enfermedad. En ocasiones, el contenido líquido de las ampollas puede ser hemorrágico (**FIGURA 5**), pudiendo incluso asociarse a cierto grado de anemia (173,264,265).



FIGURA 5. Brote extenso de formación de ampollas con contenido hemorrágico en una niña de 8 meses de edad con mastocitosis cutánea difusa.

Esto puede explicarse por el efecto anticoagulante de la heparina, que también puede ser liberada localmente por los MCs activados. Además de los síntomas locales en la piel, los pacientes con CM pueden presentar también síntomas sistémicos relacionados con la liberación de mediadores mastocitarios como *flushing*, dolor abdominal, diarrea, cefalea o, más raramente, cuadros de colapso vascular (170–172,245,266). En este sentido, existe una clara asociación entre la extensión de la afectación cutánea en niños con CM, los niveles de triptasa sérica y la severidad de los síntomas de liberación (245). Sin embargo, en los casos más sintomáticos con triptasa elevada al diagnóstico, es frecuente observar un descenso progresivo de los niveles de triptasa sérica con el tiempo, lo que puede sugerir que con la edad se produce una disminución de la masa mastocitaria total y/o de la cantidad de triptasa secretada por los MCs (170,173,267).

1.2.3.1.1. MASTOCITOSIS CUTÁNEA MACULOPAPULAR (MPCM)

La MPCM representa el tipo de afectación cutánea más frecuente en las mastocitosis, tanto en niños como en adultos, y se corresponde con el término clásico de *urticaria pigmentosa* (UP) (268). La MPCM se caracteriza por la presencia de lesiones cutáneas maculares y/o papulares, con un tamaño que oscila entre varios milímetros y pocos centímetros, de color parduzco o menos frecuentemente eritematoso, y que muestran una distribución generalmente simétrica y variable en número (169,171,173,269) (**FIGURA 6**). En ocasiones, sobre todo cuando la afectación es extensa, las lesiones cutáneas pueden tener tendencia a confluir entre ellas formando lesiones de mayor tamaño (173,245,269). Aunque la MPCM puede afectar cualquier región de la superficie corporal, tanto las palmas de las manos como las plantas de los pies suelen estar respetadas (171,269). En adultos, las lesiones suelen presentar una distribución simétrica y típicamente central, con una mayor densidad de las mismas a nivel del tronco y raíz proximal de las extremidades, en ausencia de lesiones (o presencia solo ocasional) a nivel distal (171). Curiosamente, este tipo de distribución es justamente opuesta a la distribución normal de los MCs de la dermis de sujetos sanos, en los que la mayor densidad de MCs dérmicos se encuentra en zonas distales de la superficie corporal (270), posiblemente como fenómeno de localiza-

ción estratégica para la defensa frente a agentes externos potencialmente nocivos. Por el contrario, la MPCM de inicio en edad pediátrica suele ser más heterogénea y, además del tronco, afecta con frecuencia al cuero cabelludo y las extremidades.



FIGURA 6. Mastocitosis cutánea maculopapular.

Aparte de la MPCM típica, existen otras tres formas de presentación de la MPCM que incluyen: la mastocitosis en placas, la mastocitosis nodular (NM, abreviado del inglés: “*nodular mastocytosis*”) y la *telangiectasia macularis eruptiva perstans* (TMEP). La CM en placas se caracteriza por presentar lesiones sin relieve o ligeramente sobreelevadas, de mayor tamaño y generalmente menos pigmentadas que la MPCM típica, apareciendo prácticamente de forma exclusiva en niños (171,271) (**FIGURA 7**). La NM también es típica de formas de inicio en edad pediátrica y se define por la presencia de múltiples nódulos de tamaño variable, de coloración parduzca o amarillenta (173,245,271–273) (**FIGURA 8**); en la literatura existe referencia a este tipo de CM como “mastocitosis pseudoxantomatosa” (274,275) o “mastocitosis xantelasmoidea” (276,277), por su similitud con las lesiones cutáneas típicas del xantelasma. Cabe señalar que un mismo paciente puede presentar diferentes sub-

tipos de CM simultáneamente (272) y que las características macroscópicas de las lesiones cutáneas en la CM pueden variar a lo largo del tiempo, especialmente las formas de MPCM en placas y de NM en niños (173).



FIGURA 7. Mastocitosis cutánea en placas



FIGURA 8. Mastocitosis cutánea nodular.

La TMEP (**FIGURA 9**) es una variante extremadamente rara de MPCM caracterizada por presentar máculas hiperpigmentadas de coloración eritematosa con telangiectasias habitualmente localizadas en el tronco, y que afecta casi exclusivamente a pacientes de edad adulta (269,278). En este tipo de CM, la presencia del signo de Darier es inconsistente y la formación de ampollas sobre las lesiones es excepcional, aunque puede asociar el mismo tipo de manifestaciones clínicas sistémicas relacionadas con la liberación de

mediadores mastocitarios que el resto de mastocitosis. Aunque tradicionalmente se ha considerado a la TMEP como una forma cutánea pura, ocasionalmente puede mostrar afectación sistémica (279). Desde el punto de vista histológico, la infiltración dérmica por MCs es muy limitada y éstos se disponen de forma predominante alrededor de los capilares sanguíneos, que presentan un calibre aumentado (269,280).

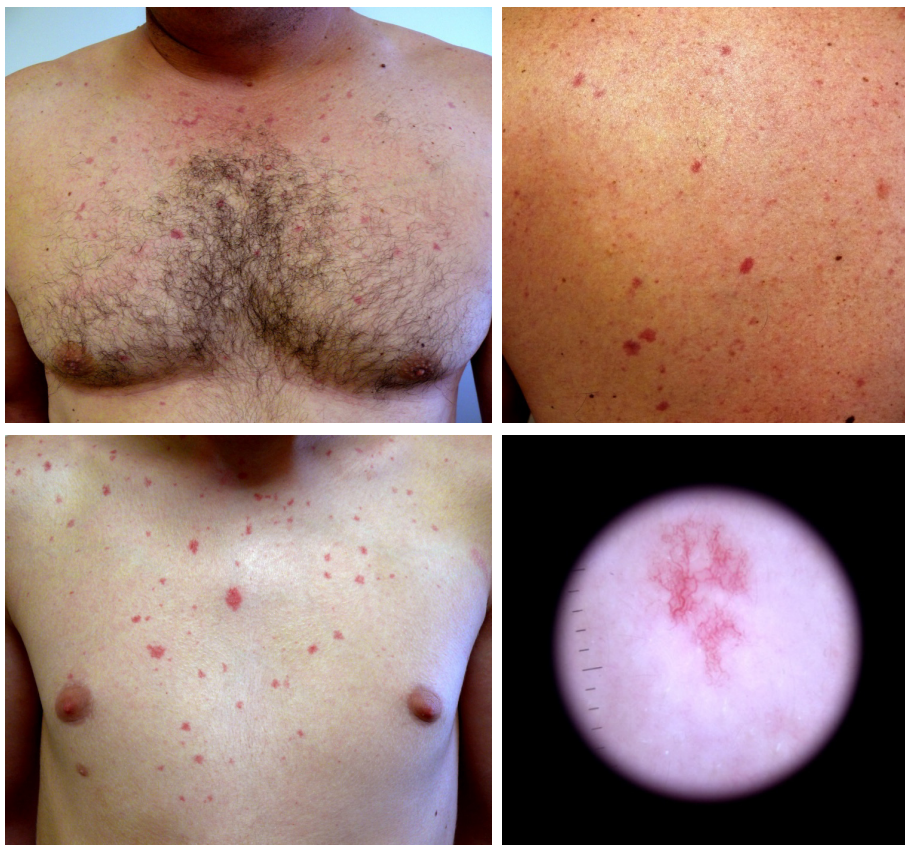


FIGURA 9. *Telangiectasia macularis eruptiva perstans.*

La nueva clasificación de consenso propuesta por la ECNM, agrupa todos los subtipos de MPCM en dos variantes (monomórfica y polimórfica) dependiendo del grado de variabilidad en términos de forma, tamaño y coloración de las lesiones cutáneas de cada paciente (173). Así, la variante monomórfica corresponde a la MPCM típica, con lesiones cutáneas homogéneas de aspecto macroscópico similar, mientras que la variante polimórfica incluye las formas atípicas de MPCM en placas y NM, así como las MPCM que presentan lesiones heterogéneas en cuanto a tamaño y forma. Un aspecto importante de esta nueva clasificación es que tiene implicaciones pronósticas en los niños, de manera que la

variante monomórfica en las mastocitosis de inicio pediátrico suele presentar niveles de triptasa sérica más altos y una mayor tendencia a la persistencia en edad adulta, respecto a la variante polimórfica (173). Por otro lado, esta nueva clasificación de la ECNM considera que la presencia de telangiectasias en las lesiones cutáneas no debe constituir un criterio para distinguir diferentes formas de CM, por lo que la TMEP no se reconoce como una variante específica de MPCM (173).

1.2.3.1.2. MASTOCITOSIS CUTÁNEA DIFUSA (DCM)

La DCM (**FIGURA 10**) se caracteriza por el engrosamiento generalizado de la piel, lo cual le confiere un aspecto típico de “piel de naranja”. Sin embargo, aunque el término “difuso” de la DCM lleva implícito una afectación cutánea extensa, no todas las formas de mastocitosis con afectación extensa de la piel pertenecen a este subtipo de CM.



FIGURA 10. Mastocitosis cutánea difusa.

En este sentido, es relativamente frecuente encontrar referencias a casos de MPCM con un elevado número de lesiones, clasificadas erróneamente como DCM, debido a una malinterpretación del término difuso como equivalente a afectación extensa (172,173,238). Si bien es cierto que durante los episodios agudos de liberación de mediadores mastocitarios, una MPCM típica puede ser indistinguible de una NM debido a la urticación y edema de

las lesiones maculopapulares que hace que parezcan lesiones nodulares, es posible diferenciar ambos tipos de CM con afectación cutánea extensa de la DCM, porque en esta última no se identifican lesiones cutáneas de manera individualizada, mientras que tanto en la MPCM como en la NM sistemáticamente se observan zonas de piel sana entre las lesiones cutáneas.

Dada la extensa afectación cutánea, la DCM es el tipo de CM que se asocia con cifras de triptasa más elevadas y una mayor severidad de las manifestaciones clínicas, tanto locales como sistémicas (171,245,269,281). La enfermedad suele debutar como brotes recurrentes de liberación de mediadores generalmente desencadenados por estímulos como la fricción de la piel, el calor, el agua caliente, la fiebre, la irritabilidad o la administración de vacunas, entre otros factores (172,245). Estos brotes se caracterizan por la formación de ampollas de gran tamaño diseminadas por toda la superficie corporal, que con frecuencia se asocian a síntomas sistémicos graves incluyendo *flushing*, síntomas digestivos, cuadros de hipotensión e incluso colapso vascular, a menos que se instaure tratamiento antimedador de base de manera precoz. A pesar de la severidad de los síntomas al inicio de la enfermedad, las manifestaciones clínicas suelen ir mejorando progresivamente durante los primeros meses o años de evolución, lo que se acompaña habitualmente de una disminución paralela de los niveles de triptasa sérica (170,281). A pesar de ello, la afectación de la piel en forma de engrosamiento cutáneo generalizado puede persistir durante años hasta su resolución definitiva o, más raramente, persistir en edad adulta; en este caso, la DCM puede acompañarse de afectación sistémica, tumores estromales del tubo digestivo (GIST, abreviado del inglés: “*gastrointestinal stromal tumor*”) y es frecuente la agregación familiar asociada a mutaciones germinales de *KIT* localizadas fuera del exón 17 (TABLA 3) (187,197,200).

1.2.3.1.3. MASTOCITOMA CUTÁNEO

El mastocitoma cutáneo es una lesión habitualmente única, redonda u ovalada, de aspecto nodular, consistencia elástica y tamaño variable que con frecuencia supera los 2 cm de diámetro. Aunque puede aparecer en cualquier localización, es más frecuente en el tronco y las extremidades. Su coloración es parduzca o amarillenta y su superficie tiene la textura de “piel de naranja” (171,173,269) (**FIGURA 11**).



FIGURA 11. Mastocitoma cutáneo.

Se trata de un tipo de CM que aparece prácticamente de forma exclusiva en niños al nacimiento o durante los primeros meses de vida y que tiende a la resolución espontánea, aunque se han descrito también casos de aparición en edad adulta (282,283). Desde el punto de vista histológico, la lesión se caracteriza por una infiltración masiva por MCs de morfología habitualmente redondeada o poligonal que afecta a toda la dermis, tanto superficial como profunda, pudiendo afectar incluso al tejido celular subcutáneo (269). Debido a la gran concentración de MCs y su proximidad a la epidermis, este tipo de CM

presenta con mucha frecuencia síntomas locales como picor, enrojecimiento, edema y la formación de una ampolla sobre la lesión, sobre todo en relación con el roce o fricción de la misma. Aunque en la mayoría de los casos los síntomas relacionados con la liberación de mediadores mastocitarios se limitan al área lesional, en ocasiones pueden aparecer síntomas a nivel sistémico como *flushing* facial, síntomas gastrointestinales, mareo e incluso síncope, probablemente debido a una activación mastocitaria masiva que genera localmente una gran cantidad de sustancias vasoactivas con capacidad de pasar a la circulación sistémica. Por ello, es importante evitar la fricción accidental de las lesiones en este tipo de CM, y muy particularmente las maniobras de provocación como el signo de Darier, especialmente en lesiones de gran tamaño (173,263). Cuando la lesión se localiza en zonas de presión como la rodilla, el pie o el codo, evitar su fricción o roce puede ser difícil y en casos muy sintomáticos puede llegar a plantearse la exéresis quirúrgica (284), aunque la tendencia natural es hacia la resolución espontánea. Dado que el mastocitoma cutáneo es en definitiva una lesión nodular, podría ser más apropiado considerar este tipo de CM como una forma localizada de NM (271).

Según la nueva clasificación de la ECNM y de la OMS, los pacientes que presentan hasta tres lesiones de este tipo serían clasificados bajo la denominación general de mastocitoma cutáneo, mientras que los pacientes con cuatro ó más mastocitomas serían clasificados como MPCM (166,173).

1.2.3.2. MASTOCITOSIS SISTÉMICA (SM)

El hecho fundamental que caracteriza la SM es la presencia de MCs patológicos (clonales) en al menos un tejido u órgano distinto de la piel, fundamentalmente la MO (166,259,285,286). A pesar de que la mayoría de pacientes con diferentes formas de SM comparten ciertas características clínicas, histopatológicas, bioquímicas y moleculares, el curso clínico y el pronóstico de la enfermedad es muy variable de unos casos a otros. Así, mientras la ISM se considera una forma de buen pronóstico con un curso crónico y una esperanza de vida similar a la de la población general, la ASM y, especialmente la MCL, se caracterizan por su mal pronóstico a medio-corto plazo (287,288). En cambio, el

pronóstico de la SM-AHNMD, aunque generalmente peor que el de la ISM, es variable y depende del pronóstico específico de cada uno de los componentes de la enfermedad, es decir, de la SM (ISM *vs.* ASM) y del tipo de hemopatía asociada (289–293).

Estos datos corroboran el impacto pronóstico de la clasificación de la SM de la OMS, que está basada fundamentalmente en criterios relacionados con la masa tumoral y la alteración secundaria de órganos como consecuencia de la infiltración mastocitaria (166,259). Sin embargo, dicha clasificación, aunque incluye en su última versión de 2016 formas quiescentes de SM (SSM, abreviado del inglés: “*smoldering systemic mastocytosis*”) (165,166), no permite identificar con precisión aquellos pacientes con ISM en riesgo de evolucionar a formas de mal pronóstico. Esta progresión clínica de la enfermedad desde una forma de buen pronóstico a una de mal pronóstico se ha considerado clásicamente como un hecho excepcional (287); no obstante, dado que dicha progresión puede ocurrir tras un tiempo de evolución variable que puede alcanzar varias décadas tras el diagnóstico de ISM, la estimación precisa de la tasa de progresión de ISM viene determinada por el tiempo de seguimiento de los pacientes. De igual forma, en ocasiones es posible constatar una historia previa de lesiones cutáneas compatibles con mastocitosis y/o síntomas de liberación de mediadores mastocitarios en pacientes cuyo diagnóstico inicial es de ASM, lo cual sugiere que la ISM y la ASM no son enfermedades diferentes sino que pueden constituir también dos espectros de una misma enfermedad que se comporta de forma dinámica y cuya principal diferencia es la capacidad proliferativa de los MCs y la carga tumoral acumulada en diferentes momentos de la evolución de la enfermedad. El análisis de los factores que podrían determinar un mayor riesgo de progresión desde ISM a formas avanzadas de la enfermedad, ha sido precisamente uno de los objetivos de esta tesis doctoral y será discutido en profundidad más adelante.

1.2.3.2.1. MASTOCITOSIS SISTÉMICA INDOLENTE (ISM)

La ISM es la forma más frecuente de SM y su diagnóstico se basa en la demostración de infiltración medular por MCs patológicos en ausencia de criterios de la OMS que definen ASM, SSM, SM-AHNMD y MCL (166,227,259,285,286,291,294,295). La ISM se caracteriza por presentar habitualmente una masa mastocitaria baja, que guarda una estrecha correlación con el tiempo de evolución de la enfermedad. Globalmente, el número de MCs de MO en pacientes con ISM es significativamente superior al de la MO de sujetos sanos, aunque su porcentaje global con respecto al resto de células nucleadas de la MO es generalmente inferior al 0.1-0.2% cuando se emplea citometría de flujo para su cuantificación (50,52). Desde el punto de vista histológico, la baja carga mastocitaria de la ISM se traduce en una infiltración medular moderada en la mayoría de los casos. En la inmensa mayoría de pacientes con ISM, los MCs de MO adoptan una morfología anormal (forma alargada y/o alteraciones en la granulación), expresan de forma aberrante el antígeno CD25 y en menor medida también CD2, y presentan la mutación D816V de *KIT*. Los niveles de triptasa sérica son variables dependiendo de la carga mastocitaria.

Desde el punto de vista clínico, la ISM es una enfermedad muy heterogénea. Cerca del 90% de los casos presentan afectación cutánea (296) y, la inmensa mayoría, síntomas relacionados con la liberación de mediadores mastocitarios variables en intensidad y frecuencia. Entre los síntomas más habituales se observa prurito, episodios de *flushing*, síntomas digestivos y anafilaxia. Algunos pacientes pueden presentar hepatomegalia o esplenomegalia moderadas y más raramente adenopatías, pero no existen signos de disfunción orgánica. Como se ha comentado previamente, aunque el pronóstico de la ISM es en general bueno, algunos pacientes pueden progresar a formas avanzadas de la enfermedad.

1.2.3.2.2. MASTOCITOSIS SISTÉMICA QUIESCENTE O “SMOLDERING” (SSM)

El diagnóstico de SSM se basa en la presencia de dos o más criterios-B (*B-findings*) sin asociar ninguno de los criterios-C de la OMS (165,166,259) (TABLA 5). En realidad, se trata de una forma de ISM con elevada carga mastocitaria, lo que equivaldría a un estadio evolutivo intermedio entre la ISM y la ASM (291). El pronóstico de la SSM es variable,

existiendo casos que presentan una progresión franca a ASM y otros en los que la enfermedad permanece estable durante décadas (297–299).

TABLA 5. Criterios B y C para la subclasificación de la mastocitosis sistémica según la OMS.

CRITERIOS DIAGNÓSTICOS		FORMAS CLÍNICAS		
		ISM	SSM	ASM
B	Infiltración mastocitaria de MO >30%* y triptasa sérica >200 µg/L	≤1	≥2	0-3
	MO hiper celular con signos de displasia y sin criterios de SMD/NMP			
	Adenopatías (>2 cm) y/o megalias sin datos de disfunción orgánica			
C	Hb <10 g/dL y/o neutrófilos <1.0x10 ⁹ /L y/o plaquetas <100x10 ⁹ /L	0	0	≥1
	Hepatomegalia con aumento de enzimas, ascitis y/o hipertensión portal			
	Malabsorción con hipoalbuminemia y pérdida de peso			
	Lesiones osteolíticas de gran tamaño y/u osteoporosis severa con fracturas patológicas			

Adaptado de la referencia (259).

*Mediante técnicas de inmunohistoquímica.

OMS, Organización Mundial de la Salud; ISM, mastocitosis sistémica indolente; SSM, mastocitosis sistémica quiescente (*smoldering*); ASM, mastocitosis sistémica agresiva; MO, médula ósea; SMD, síndrome mielodisplásico; NMP, neoplasia mieloproliferativa; Hb, hemoglobina.

1.2.3.2.3. MASTOCITOSIS SISTÉMICA AGRESIVA (ASM)

El hallazgo fisiopatológico fundamental que define a la ASM es el daño orgánico como consecuencia de la infiltración tisular por MCs, traducido en la presencia de al menos uno de los criterios-C (*C-findings*) definidos por la OMS para la subclasificación de los diferentes tipos de SM (165,166,259) (TABLA 5). El examen de la MO de pacientes con ASM muestra una infiltración medular marcada por MCs que puede alterar la arquitectura normal de la MO (291,300,301) y que con frecuencia se asocia a un grado variable de fibrosis medular y/u osteoesclerosis (302,303). En la mayoría de los casos, los MCs expresan de forma aberrante el antígeno CD25 y presentan un fenotipo inmaduro caracterizado por niveles bajos de expresión (o negatividad) para CD2 y FcεRI (304). La mutación D816V de *KIT* está presente en prácticamente todos los casos de ASM y típicamente afecta a todo el compartimento mieloide o a los compartimentos mieloide y linfoide de MO (176,296). Desde el punto de vista analítico, los niveles de triptasa sérica suelen estar muy elevados (con frecuencia >200 µg/L) como consecuencia de la elevada

masa mastocitaria que presentan. Además, recientemente se ha demostrado que la presencia combinada de niveles aumentados de β_2 -microglobulina y disminuidos de LDH sérica está típicamente asociada a ASM (296).

Clínicamente, no es rara la ausencia de afectación cutánea y de síntomas relacionados con la liberación de mediadores mastocitarios, mientras que las organomegalias y el síndrome constitucional suelen estar presentes en un porcentaje significativo de pacientes (292).

En la clasificación OMS de 2016, dentro de la ASM se distinguen dos variantes de acuerdo al porcentaje de MCs en muestras del aspirado de MO: la ASM típica, con <5% de MCs en MO, y la ASM en transformación a MCL (ASM-t), con 5-19% de MCs en MO (166).

1.2.3.2.4. MASTOCITOSIS SISTÉMICA ASOCIADA A OTRA HEMOPATÍA CLONAL DE LÍNEA NO MASTOCITARIA (SM-AHNMD o SM-AHN)

La SM-AHNMD se considera el segundo subtipo de SM en frecuencia, tras la ISM (287). Generalmente, ambas neoplasias (SM y hemopatía asociada) se diagnostican simultáneamente (290), aunque también cabe la posibilidad de que la neoplasia hematológica asociada se desarrolle en pacientes diagnosticados previamente de mastocitosis tras un tiempo de evolución variable (305), o que el diagnóstico de SM se realice después de diagnosticada la hemopatía asociada (306). Tanto la SM como la neoplasia hematológica asociada que componen la SM-AHNMD deben ser categorizadas de acuerdo a los criterios diagnósticos establecidos para cada una de ellas. Así, el componente mastocitario puede corresponderse con una ISM o una ASM, mientras que las hemopatías asociadas más frecuentes son de línea mieloide, especialmente la leucemia mielomonocítica crónica (LMMC), síndromes mielodisplásicos (SMD) y leucemias mieloblásticas agudas (LMA) (290,307), habiéndose descrito también hemopatías de estirpe linfoide como mieloma múltiple y linfomas (305,307). En ocasiones, uno de los componentes neoplásicos de la SM-AHNMD presenta una marcada ventaja proliferativa con respecto al otro, lo que puede originar una infiltración medular tal que llegue a “ocultar” la otra neoplasia (215,308).

En la SM-AHNMD, los niveles de triptasa sérica suelen ser $>200 \mu\text{g/L}$ y es característico encontrar en la MO y/o en la sangre periférica de estos pacientes hallazgos relacionados con la hemopatía asociada como leucocitosis, displasia o presencia de blastos, entre otros. Clínicamente puede observarse cualquiera de los síntomas y signos típicos de la SM y, como en otras formas de mastocitosis avanzadas, es frecuente el síndrome constitucional y la ausencia de lesiones cutáneas, a lo que hay que añadir las manifestaciones clínicas correspondientes a la hemopatía asociada.

Las características histológicas, citomorfológicas e inmunofenotípicas de los MCs en la SM-AHNMD son idénticas a las observadas en el correspondiente subtipo de SM que la compone (ISM o ASM). Desde el punto de vista molecular, se han observado diferentes patrones de afectación de la hematopoyesis por la mutación de *KIT* dependiendo del tipo de hemopatía asociada. Así, es posible detectar la mutación de *KIT*, aparte de en los MCs, en el componente celular involucrado en la hemopatía asociada a la SM en la gran mayoría ($>80\%$) de pacientes con SM asociada a LMMC, en un pequeño porcentaje (20-30%) de casos asociados a neoplasias mieloproliferativas (NMP) crónicas o LMA, y prácticamente en ningún caso de SM asociada a síndromes linfoproliferativos (309). Estos hallazgos denotan la extraordinaria heterogeneidad de la SM-AHNMD y sugieren el posible desarrollo de ambos procesos a partir de un precursor hematopoyético común en un porcentaje significativo de casos asociados a enfermedades hematológicas de estirpe mieloide; por el contrario, en la SM-AHNMD asociada a procesos linfoproliferativos, dicha asociación parece deberse más bien a la aparición coincidente de dos poblaciones hematopoyéticas clonales independientes (290,305). Además de la mutación de *KIT*, los pacientes con SM-AHNMD pueden presentar, tanto alteraciones citogenéticas propias de la hemopatía asociada, como mutaciones de los genes *ASXL1* (310–312), *SRSF2* (311,313), *TET2* (310,312,314), *CBL* (311), *RAS* (311,315), *EZH2* (311) y *RUNX1* (311), entre otras anomalías moleculares. En general, el pronóstico de la SM-AHNMD es adverso, aunque depende fundamentalmente de las características propias de la mastocitosis (ISM vs. ASM) y del tipo de hemopatía asociada.

1.2.3.2.5. LEUCEMIA DE MASTOCITOS (MCL)

La MCL es una forma rara de mastocitosis que representa <1% de todos los casos, habiéndose descrito hasta la fecha cerca de medio centenar de pacientes, la mayoría de ellos en forma de casos clínicos aislados. La MCL se caracteriza por una elevada capacidad proliferativa de los MCs tumorales y su tendencia a la diseminación leucémica, lo que ocasiona la infiltración de múltiples órganos como bazo, hígado, ganglios linfáticos, peritoneo, hueso y MO. La MCL posee una gran similitud desde el punto de vista clínico y biológico con la ASM, de la que se diferencia por el grado de infiltración de tejidos hematopoyéticos evaluado mediante el recuento citológico de muestras del aspirado medular y de sangre periférica. De este modo, el diagnóstico de MCL clásica se basa en la demostración de un porcentaje de MCs $\geq 20\%$ en MO y $\geq 10\%$ en sangre periférica (259), aunque existe una variante denominada MCL aleucémica, en la cual el porcentaje de MCs circulantes es <10% (316–318). Morfológicamente, los MCs de la MCL suelen mostrar una marcada atipia celular que se corresponde con elementos más inmaduros como son los promastocitos, los blastos metacromáticos y los blastos agranulares. Desde el punto de vista inmunofenotípico también destaca un perfil de MC inmaduro caracterizado por menor expresión de CD117, Fc ϵ RI y HLA-I, acompañada generalmente de negatividad para CD2 y sobreexpresión de CD123, HLA-DQ y HLA-DR (304). Aunque en más de la mitad de los pacientes se detecta la mutación D816V de *KIT* (176), se han descrito casos con mutaciones que afectan a los exones 9, 10, 11 y 13 (194,199,209,319) y, como ocurre en otras formas de SM avanzada, el patrón de afectación molecular de la hematopoyesis es generalmente multilíneal (176).

La MCL generalmente aparece *de novo*, aunque también se han descrito casos originados como consecuencia de la progresión de ISM (320,321), ASM (322) o SM-AHNMD (287). Clínicamente, es frecuente la presencia de síntomas de activación mastocitaria, de síndrome constitucional y de organomegalias, mientras que solo un tercio de los casos presentan afectación cutánea (323). La MCL suele cursar con niveles de triptasa sérica superiores a 200 $\mu\text{g/L}$ junto a citopenias de grado variable y una alta tasa proliferativa (>50% de MCs Ki-67+), con un pronóstico infausto a corto plazo y una supervivencia

generalmente inferior a 6 meses. Sin embargo, existen casos de MCL que presentan tasas de proliferación más bajas (<10% de MCs Ki-67+) en cuyo caso el curso clínico es más insidioso y la supervivencia algo mejor. Estas diferencias en el curso evolutivo de la MCL ha dado lugar a una propuesta de subclasificación con impacto pronóstico que distingue dos variantes denominadas MCL aguda y MCL crónica, y que vendrían definidas por la presencia o ausencia, respectivamente, de criterios-C, respectivamente (324). Como consecuencia de esta gran heterogeneidad de la MCL, la versión más reciente de la clasificación de la OMS de 2016 distingue entre MCL aguda y crónica, primaria y secundaria, y leucémica y aleucémica (166).

1.2.3.2.6. SARCOMA DE MASTOCITOS (MCS)

El MCS es una forma extremadamente rara de mastocitosis de la que se han descrito apenas 20 casos hasta el momento (325). Se presenta como una masa unifocal compuesta por MCs muy indiferenciados que invade localmente un determinado tejido (extramedular), con un patrón de crecimiento altamente destructivo e infiltración frecuente de los órganos adyacentes. Desde el punto de vista histológico, el MCS se caracteriza por una marcada infiltración tisular por MCs pleomórficos de gran tamaño, con núcleo multilobulado y marcada atipia celular. Se han descrito casos de MCS en localizaciones tan diversas como hueso (188,210,326,327), tracto gastrointestinal (223,328), laringe (329), cerebro (330), oído (188,331), labio (188), cavidad torácica (323), piel (332), útero (333), y ganglios linfáticos (323). El MCS en ocasiones se presenta de forma concomitante con una SM subyacente (323,327), y con frecuencia se produce una diseminación leucémica secundaria (329). Puede afectar a pacientes de cualquier edad y habitualmente el pronóstico a corto plazo es muy adverso, con una supervivencia generalmente menor de 1 año (325).

1.2.3.2.7. FORMAS PROVISIONALES DE MASTOCITOSIS

Aunque la clasificación actual de la OMS únicamente distingue los tipos de mastocitosis antes descritos, los avances diagnósticos que han tenido lugar en los últimos años han permitido la identificación de nuevas variantes clínicas de SM con entidad propia que,

por este motivo, han sido incorporadas como variantes provisionales de SM en base a la presencia, en cada una de ellas, de características singulares que las definen y diferencian de otros subtipos convencionales de SM. Estas variantes provisionales de SM incluyen: 1) la leucemia mielomastocítica (MML, abreviado del inglés: “*myelomastocytic leukemia*”), y 2) la ISM sin lesión cutánea asociada a anafilaxia (ISM_{s-}).

La MML es una forma de SM caracterizada por una infiltración medular por un SMD con exceso de blastos o una LMA, acompañada de un incremento (>10%) en sangre periférica o MO de MCs inmaduros (blastos metacromáticos) con morfología redondeada, sin expresión aberrante de CD25 ni CD2, ni mutación de *KIT*, en ausencia de criterios diagnósticos de SM según la OMS (324,334,335). Característicamente, los MCs de la MML no forman agregados compactos en la MO, sino que infiltran intersticialmente de manera difusa la médula. El grado de inmadurez morfológica de los blastos metacromáticos en la MML se corresponde inmunofenotípicamente con una expresión muy baja de proteasas citoplasmáticas y de FcεRI, y en ocasiones se han descrito alteraciones citogenéticas complejas (324). El diagnóstico diferencial de la MML incluye la MCL, la mastocitosis sistémica bien diferenciada (WDSM, abreviado del inglés: “*well-differentiated systemic mastocytosis*”) y la leucemia aguda de basófilos (301). El pronóstico por lo general es malo, aunque algunos pacientes pueden responder a quimioterapia y/o al trasplante de progenitores hematopoyéticos (336).

La ISM_{s-} es una variante clínica que se distingue del resto de ISM por la ausencia sistemática de afectación cutánea, siendo su forma de presentación la aparición de síntomas relacionados con la liberación de mediadores mastocitarios (229,230,285). La ausencia de afectación cutánea en estos casos ha llevado a algunos autores a denominar también a este tipo de SM como “mastocitosis aislada de MO” (BMM, abreviado del inglés: “*bone marrow mastocytosis*”). Sin embargo, este término lleva implícito que la presencia de MCs patológicos está restringida a la MO lo cual, ni ocurre necesariamente, ni es un hallazgo que defina a la entidad. Por este motivo, otros autores prefieren referirse a esta variante como ISM sin lesión cutánea asociada a anafilaxia, lo que refleja más fielmente sus principales características clínicas, limitando el uso del término BMM a aquellos pa-

cientes que no presentan lesiones cutáneas ni tampoco síntomas de liberación de mediadores mastocitarios, en los que el diagnóstico de SM se realiza de manera fortuita al llevar a cabo un estudio de MO por un motivo diferente (337). La ISMs- representa un tipo de SM que puede pasar fácilmente desapercibido debido a que los pacientes presentan síntomas que son idénticos a los de las enfermedades alérgicas, no disponiendo en el momento de iniciar este trabajo de criterios eficientes que permitan sospechar la presencia de una ISMs-; así, el estudio de las particularidades clínicas y biológicas de esta nueva variante de SM y su posible repercusión pronóstica, constituye también uno de los objetivos de esta tesis doctoral.

1.2.3.2.8. MASTOCITOSIS SISTÉMICA BIEN DIFERENCIADA (WDSM)

La WDSM fue descrita por primera vez por Akin *et al.* en 2004, al describir una paciente de 25 años de edad con ASM (199). En el estudio medular realizado al diagnóstico, los MCs de la paciente presentaban una morfología redondeada y abundante granulación, careciendo de expresión aberrante de CD25 y CD2; estos hallazgos morfológicos y fenotípicos de los MCs patológicos típicos de MCs bien diferenciados son excepcionales en la SM típica. Además, la paciente presentaba una mutación germinal en el dominio transmembrana de *KIT* que no había sido descrita previamente, consistente en la sustitución del aminoácido fenilalanina en el codón 522 del gen por un residuo cisteína (*KIT* F522C), que demostró ser sensible a imatinib. Posteriormente, tan solo se han descrito pacientes aislados con las mismas características morfológicas y fenotípicas de MC maduro bien diferenciado, algunos de ellos asociados a mutaciones de *KIT* localizadas fuera del dominio catalítico de la molécula, pero diferentes de la descrita inicialmente por Akin *et al.* (199); entre éstas se incluye, por ejemplo, la mutación K509I, que también ha demostrado ser sensible a imatinib (197,198). El principal factor limitante para una correcta identificación de la WDSM es la carga mastocitaria total, especialmente en aquellos casos que muestran una carga mastocitaria baja y que por ello frecuentemente no cumplen los criterios diagnósticos de SM (ausencia de mutación de *KIT* en el codón 816, fenotipo CD25-/CD2- y morfología mastocitaria bien diferenciada, asociada a niveles normales de

triptasa sérica), lo que condiciona que con una alta probabilidad resulte difícil establecer el carácter sistémico de la enfermedad y ésta quede clasificada incorrectamente como CM. Todo ello refleja la necesidad de definir mejor esta entidad de cara a disponer de criterios diagnósticos específicos para WDSM, uno de los objetivos de esta tesis doctoral. Fruto del trabajo realizado en los últimos años, la OMS ha incluido por primera vez en 2016 una referencia a la WDSM, apuntando a que cada uno de los subtipos de SM debe reflejar si se corresponde o no con esta entidad mediante el sufijo “_{WD}” (abreviado del inglés: “*well-differentiated*”) colocado a continuación del nombre del subtipo específico de SM que corresponda (p. ej., ISM_{WD} o MCL_{WD}) (166).

1.2.4. CRITERIOS DIAGNÓSTICOS DE MASTOCITOSIS

El diagnóstico de la mastocitosis se basa fundamentalmente en la identificación de MCs patológicos en uno o más tejidos mediante estudios inmunohistoquímicos, citomorfológicos, inmunofenotípicos y moleculares. Dependiendo del tipo de órgano o tejido afectado, se pueden distinguir dos categorías principales de mastocitosis: 1) CM, que afecta exclusivamente a la piel, y 2) SM, en la que se produce una infiltración por MCs patológicos en al menos dos tejidos diferentes, principalmente la piel y la MO, pero también otros tejidos. Por lo tanto, el diagnóstico definitivo de mastocitosis requiere el estudio de la MO, tanto para confirmar el carácter sistémico de la SM, como para descartar la afectación medular en la CM (259,285,286,303). Recientemente se ha propuesto el término “mastocitosis en la piel” (MIS, abreviado del inglés: “*mastocytosis in the skin*”) como diagnóstico provisional en aquellos pacientes con afectación cutánea demostrada en los que está pendiente la realización de un estudio de MO que permita establecer el diagnóstico final de CM *vs.* SM (285). Sin embargo, dada la tendencia natural a la regresión espontánea de la enfermedad en niños con MIS, en aquellos que presentan una triptasa sérica <20 µg/L generalmente se tiende a asumir el diagnóstico de CM sin necesidad de realizar el estudio de la MO; por el contrario, si presentan cifras >20 µg/L se establece el diagnóstico de MIS y se recomienda seguimiento al menos hasta la pubertad, momento en el que debería realizarse el estudio de MO si persistieran las lesiones cutáneas (172,285,286). En

contraposición, en adultos que presentan lesiones cutáneas compatibles se recomienda realizar el estudio de MO para confirmar el carácter sistémico de la enfermedad independientemente de los niveles de triptasa sérica que presenten, dada la baja frecuencia de CM en edad adulta.

1.2.4.1. CRITERIOS DIAGNÓSTICOS DE MASTOCITOSIS CUTÁNEA

El examen histomorfológico de las lesiones cutáneas representa la piedra angular en el estudio diagnóstico de la afectación cutánea en la mastocitosis. Dadas las diferencias que se pueden observar en cuanto a la distribución de MCs en la piel normal de diferentes áreas de la superficie corporal (270), la correcta interpretación histológica requiere una evaluación individualizada del número de MCs en función del sitio concreto del que se obtiene la muestra de biopsia, comparándolo con el número esperado de MCs en dicha localización en sujetos sanos. El diagnóstico de MIS se basa en la demostración histológica de agregados de >15 MCs o, en ausencia de agregados, la presencia de >20 MCs en un campo de gran aumento ($\times 40$) (285). La tinción de inmunohistoquímica recomendada a tal efecto es la que utiliza anticuerpos anti-triptasa, aunque otras tinciones como la hematoxilina-eosina, Wright-Giemsa, Kit (CD117) y azul de toluidina pueden ser útiles también para la identificación de los MCs dérmicos. Además de estas tinciones, estudios recientes han sugerido la potencial utilidad de la tinción con CD25 en biopsias cutáneas para predecir afectación sistémica en pacientes con MIS (338).

En términos generales, en la mastocitosis se han descrito cuatro patrones histológicos de infiltración dérmica por MCs (269) (**FIGURA 12**), que incluyen: 1) patrón perivascular, que afecta fundamentalmente a la dermis papilar, 2) patrón intersticial, 3) patrón nodular, y 4) patrón difuso (ó “en sábana”), que afecta a toda la dermis papilar y a la porción superior de la dermis reticular. Algunos de estos patrones de afectación histológica parecen guardar cierta correlación con las distintas formas clínicas de afectación cutánea en la mastocitosis. Así, mientras que el patrón perivascular se observa generalmente en lesiones cutáneas de pequeño tamaño y bajo relieve típicas de la MPCM y la TMEP, el patrón difuso suelen corresponderse con casos de NM (incluyendo el mastocitoma cutá-

neo) y la mayoría de las DCM. Por otro lado, el patrón intersticial es más variable, pudiendo encontrarse en cualquiera de las formas clínicas, y el patrón nodular es más característico de las NM. En caso de que el examen histológico de la piel no sea concluyente, el diagnóstico de MIS puede establecerse mediante la demostración de mutaciones activantes de *KIT* en una muestra de piel afectada (173,285). Tanto los criterios aceptados para el diagnóstico de MIS, como el tipo de tinciones inmunohistoquímicas recomendadas para ello, son aplicables al estudio del MCS, si bien en esta última entidad, al igual que ocurre en la CM, la ausencia de infiltración medular por MCs es una condición *sine qua non* para establecer el diagnóstico definitivo de la misma (259).

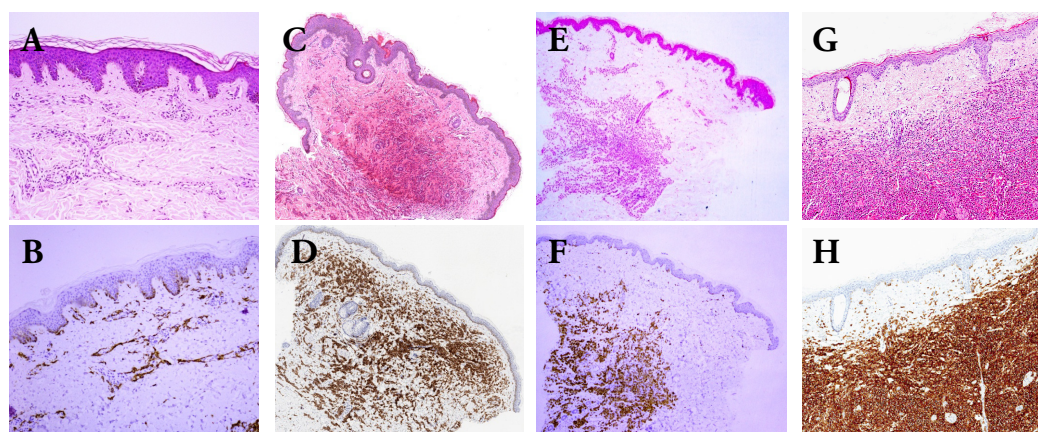


FIGURA 12. Patrones histológicos de mastocitosis cutánea.

A-B, patrón perivascular (A, tinción con hematoxilina-eosina x10; B, tinción con Kit x10); C-D, patrón intersticial (C, tinción con hematoxilina-eosina x4; D, tinción con Kit x4); E-F, patrón nodular (E, tinción con hematoxilina-eosina x4; F, tinción con Kit x4); G-H, patrón intersticial (G, tinción con hematoxilina-eosina x10; H, tinción con Kit x10)

1.2.4.2. CRITERIOS DIAGNÓSTICOS DE MASTOCITOSIS SISTÉMICA

Los criterios actuales de la OMS para el diagnóstico de SM se basan en el estudio de ciertas características de los MCs de MO, junto a la evaluación de los niveles séricos de triptasa. Así, la OMS reconoce cinco criterios diagnósticos para SM (uno mayor y cuatro menores) requiriéndose para el diagnóstico de SM la presencia del criterio mayor y al menos un criterio menor o, en ausencia del criterio mayor, de tres ó más criterios menores (227,259,285,286,291,294,295) (**TABLA 6**).

TABLA 6. Criterios diagnósticos de mastocitosis sistémica según la OMS (OMS, 2008).

CRITERIO MAYOR	Agregados de >15 MCs en la biopsia de MO (o en otro órgano extracutáneo)
CRITERIOS MENORES	>25% de MCs con morfología anormal en el aspirado de MO
	Expresión aberrante de CD25 y/o CD2 en MCs de MO
	Mutación en el codón 816 de <i>KIT</i>
	Triptasa sérica >20 µg/L

Adaptado de la referencia (259).

OMS, Organización Mundial de la Salud; MC, mastocito; MO, médula ósea.

El criterio mayor consiste en la presencia de agregados compactos multifocales constituidos por >15 MCs, en muestras de biopsia de MO (o de otro tejido extracutáneo) (**FIGURA 13**). Las tinciones de inmunohistoquímica recomendadas para la identificación de MCs en la MO son las de la triptasa y Kit. Los agregados de MCs de MO de pacientes con SM pueden tener una localización paratrabecular, perivascular o intersticial, y con frecuencia se acompañan de acúmulos de linfocitos con un número variable de eosinófilos y cierto grado de fibrosis. En pacientes con formas avanzadas de SM, la infiltración medular por inmunohistoquímica suele ser >20-30% y los niveles de triptasa sérica >200 µg/L, lo que permite establecer el diagnóstico basado exclusivamente en el estudio histológico de la MO y en la medición de la triptasa sérica, sin necesidad de otros criterios en prácticamente el 100% de los casos. Por el contrario, un porcentaje significativo de pacientes con ISM presentan una carga mastocitaria muy baja sin agregados de MCs en la MO y, con relativa frecuencia, valores de triptasa sérica <20 µg/L; por ello en estos casos, la demostración del carácter neoplásico de los MCs requiere de los demás criterios menores para el diagnóstico de SM, según se detallará a continuación.

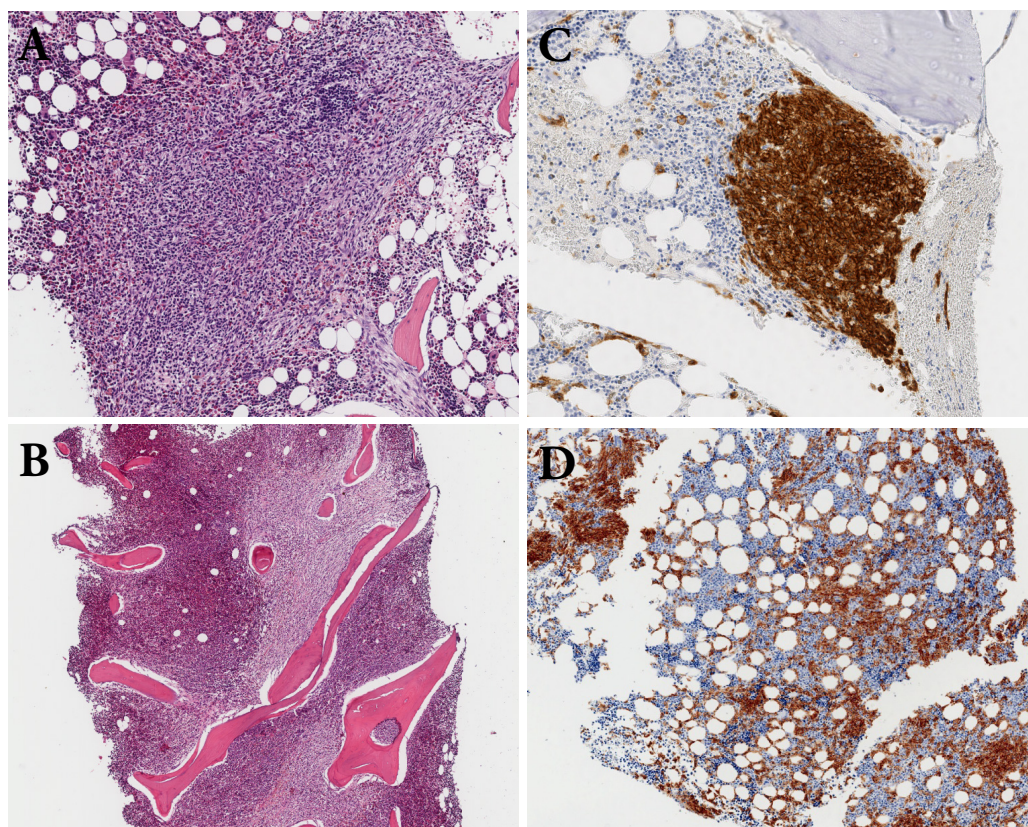


FIGURA 13. Agregados de mastocitos en biopsias de médula ósea de pacientes con mastocitosis sistémica.

A, tinción con hematoxilina-eosina (x10); B, tinción con hematoxilina-eosina (x4); C, tinción con Kit (x10); D, tinción con Kit (x8)

Desde el punto de vista citomorfológico, los MCs de la SM típicamente presentan una forma alargada con prolongaciones citoplasmáticas, núcleo excéntrico y alteraciones de la granulación (p. ej., hipogranulación o fusión granular) (MCs atípicos tipo I) (286,295,339) (**FIGURA 14**). En las formas avanzadas de la enfermedad es frecuente la presencia en la MO de MCs de aspecto más inmaduro, con cromatina laxa, una relación núcleo/citoplasma aumentada y núcleos bi- o polilobulados (MCs atípicos tipo II o promastocitos) (**FIGURA 14**). Más raramente, existen casos de SM en los que la MO está infiltrada por MCs redondos y bien granulados, indistinguibles morfológicamente de MCs normales (194,197–199). La presencia en la histología de MO de agregados de células redondas que expresan triptasa se ha denominado TROCI (abreviado del inglés: “*tryptase-positive round cell infiltrate*”) (340) (**FIGURA 15**), pudiendo estar presente este tipo de lesiones de forma focal o difusa, que constituye un hallazgo histológico característico

de la WDSM y la MML, aunque también pueden detectarse ocasionalmente en algunos pacientes con SM típica. La diferenciación entre estas tres entidades requiere del estudio inmunofenotípico de los MCs ya sea por citometría de flujo o por inmunohistoquímica, permitiendo éste además el diagnóstico diferencial con otras enfermedades en las que también pueden detectarse TROCI como la LMA, la leucemia mieloide crónica (LMC) y la leucemia crónica de basófilos (301,340).

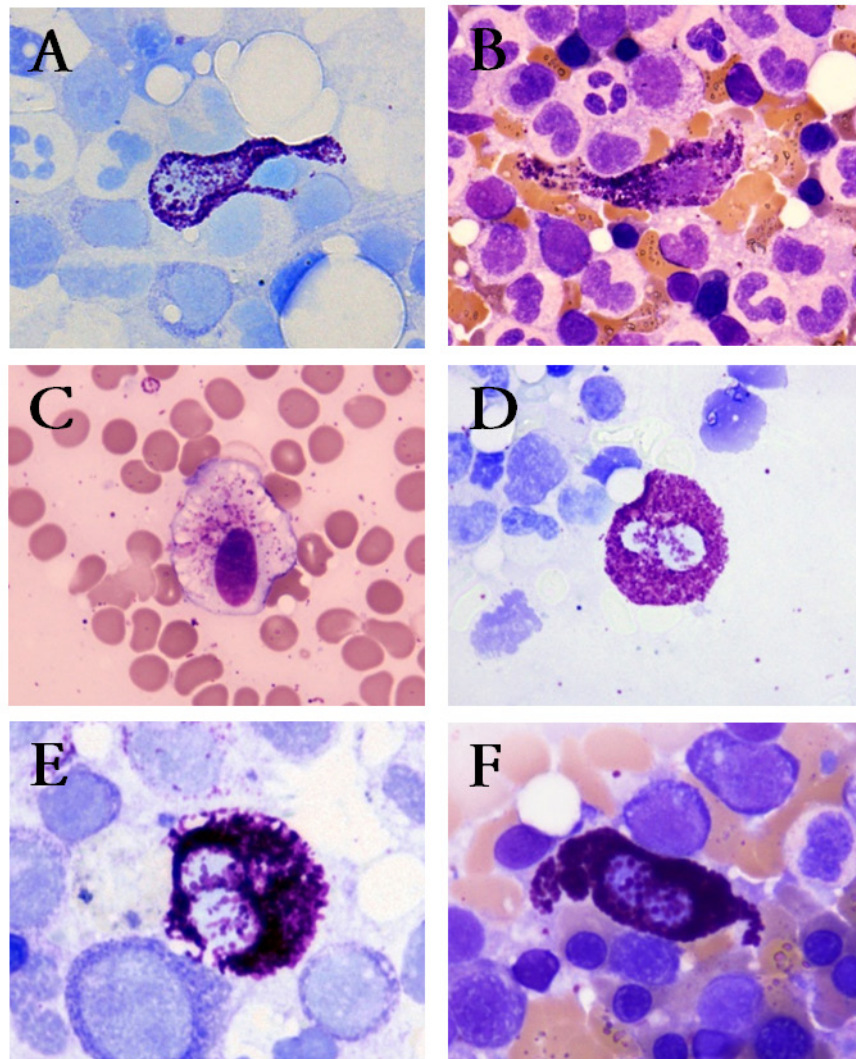


FIGURA 14. Mastocitos con morfología anormal en muestras de aspirado de médula ósea de pacientes con mastocitosis sistémica.

A-C, mastocitos atípicos tipo I (A, tinción con azul de toluidina x100; B y C tinción con May-Grünwald-Giemsa x100); D-F, mastocitos atípicos tipo II (promastocitos) (D y E, tinción con azul de toluidina x100; F, tinción con May-Grünwald-Giemsa x100)

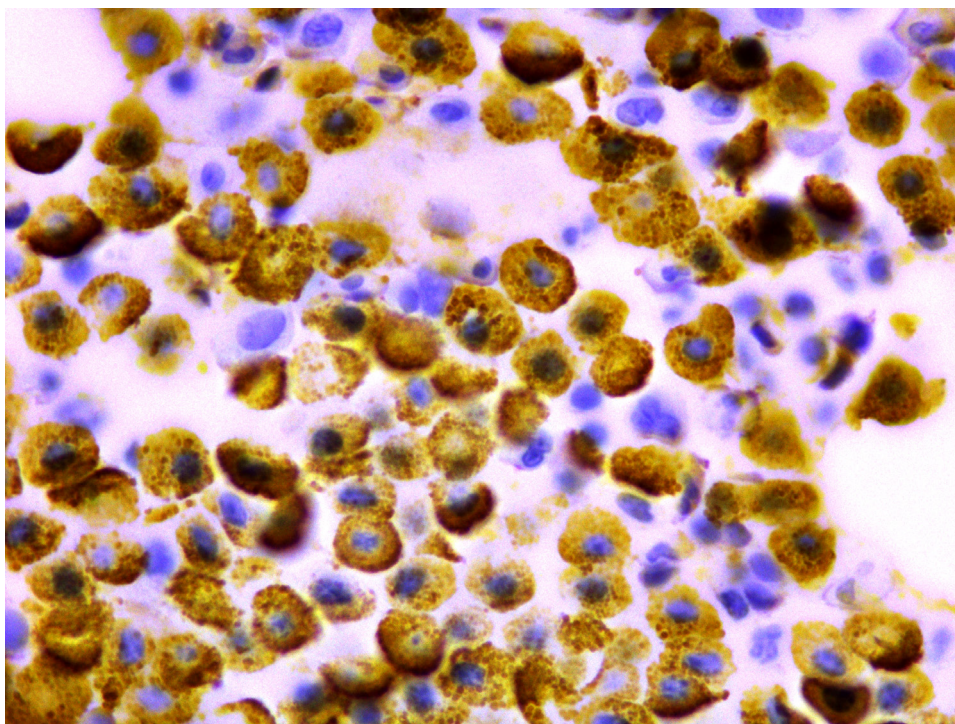


FIGURA 15. Agregado de células redondas que expresan triptasa (“TROCI”) en una biopsia de MO de un paciente con WDSM.

Tinción con triptasa (x 100)

Desde el punto de vista fenotípico, los MCs de MO de las formas típicas de SM se caracterizan por la expresión aberrante y de alta intensidad de CD25 y CD2 (50–52,64,304,341,342) (**FIGURA 16**). Aunque la OMS reconoce la presencia de cualquiera de los dos marcadores como criterio diagnóstico menor de SM, la expresión aberrante de CD25 en los MCs ha demostrado ser mucho más sensible que la de CD2, puesto que existe un número significativo de pacientes con SM cuyos MCs no expresan este último antígeno (343). Más recientemente, la proteína de membrana CD30 ha surgido como un nuevo marcador aberrante de SM que, aunque sigue sin estar incluido en los criterios diagnósticos de SM de la OMS, puede servir como apoyo diagnóstico en algunos casos, especialmente en la WDSM. Así, se ha observado expresión aberrante de CD30 en los MCs de MO de alrededor del 80% de las SM, incluyendo la WDSM (344). El estudio inmunofenotípico de la expresión de estas proteínas puede realizarse mediante inmunohistoquímica (345–347) o citometría de flujo (50–52,64,65,304,341–344), aunque esta última técnica posee una mayor rentabilidad diagnóstica, especialmente en aquellos casos en los que la infiltración mastocitaria es baja; además, la mayor precisión de la citometría

de flujo a la hora de realizar una evaluación cuantitativa de la expresión de estos marcadores permite identificar patrones inmunofenotípicos asociados a diferentes categorías de SM: fenotipo activado asociado a ISM, fenotipo maduro típico de la WDSM, y fenotipo inmaduro característico de SM avanzadas (304).

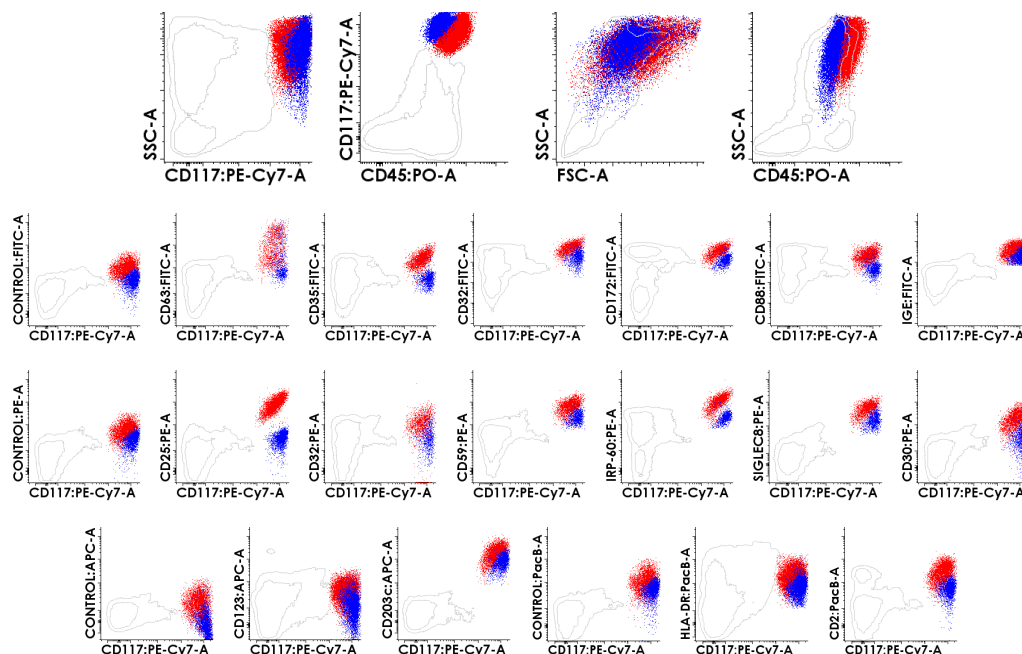


FIGURA 16. Principales marcadores inmunofenotípicos identificados por citometría de flujo en mastocitos de médula ósea de pacientes con mastocitosis sistémica vs. sujetos sanos.

■ Mastocitos patológicos
■ Mastocitos normales

La presencia de mutaciones en el codón 816 de *KIT* constituye otro de los criterios diagnósticos menores de SM. Cabe señalar que aunque la mayoría (>95%) de pacientes con SM son portadores de este tipo de mutaciones, su presencia no es específica de SM y pueden detectarse también en otras enfermedades como la LMA (348), el seminoma (349), tumores de células germinales (350) y el GIST (351). Dado que la población mastocitaria neoplásica constituye una fracción minoritaria de MO, en muchos pacientes con SM, especialmente en las formas indolentes de la enfermedad, el estudio de las mutaciones de *KIT* requiere de la utilización de técnicas diagnósticas altamente sensibles con el fin de evitar resultados falsamente negativos. Las técnicas recomendadas actualmente por la ECNM para el estudio de las mutaciones de *KIT* incluyen (285): 1) PCR en tiem-

po real con estudio de polimorfismos de longitud mediante fragmentos de restricción (RT-PCR + RFLP, abreviado del inglés: “*real-time polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism*”), 2) PCR con sondas de hibridación y bloqueo de la secuencia silvestre mediante péptido ácidonucleico (PNA-PCR, abreviado del inglés: “*peptide nucleic acid-mediated polymerase chain reaction*”), y 3) PCR cuantitativa alelo-específica (ASOqPCR, abreviado del inglés: “*quantitative polymerase chain reaction with allele-specific oligonucleotides*”). Comparado con las otras técnicas, la PNA-PCR tiene la ventaja de que permite detectar no solo la mutación D816V de *KIT*, sino también otras mutaciones localizadas en el codón 816 (y en los codones vecinos) de la molécula. Para aumentar todavía más la rentabilidad diagnóstica del estudio molecular en SM, especialmente en los casos que presentan baja carga mastocitaria, se recomienda además aplicar procedimientos de enriquecimiento previo al análisis de la mutación como la purificación de los MCs patológicos mediante citometría de flujo (FACS, abreviado del inglés: “*fluorescence-activated cell sorting*”) (176).

El cuarto criterio diagnóstico menor de SM consiste en la demostración de niveles de triptasa sérica $>20 \mu\text{g/L}$. Dado que prácticamente la totalidad de la triptasa presente en el suero proviene de los MCs, el nivel de triptasa sérica se considera constituye un marcador indirecto de la carga mastocitaria total del individuo, en ausencia de síntomas de activación mastocitaria (120), con una mediana de $5 \mu\text{g/L}$ en adultos sanos y algo menor en niños (119,285). La correlación entre los niveles séricos de triptasa y la carga mastocitaria determina que la presencia de valores $<20 \mu\text{g/L}$ no sean excluyentes de SM, como ocurre con frecuencia en la ISM. Por el contrario, es posible detectar niveles incrementados de triptasa sérica en determinadas situaciones diferentes a SM como son la insuficiencia renal severa (352), la urticaria crónica (353), la anafilaxia (117,122) o diversas hemopatías como la LMA, los SMD, la LMC u otras NMP (354). En este sentido, merece destacar que según la OMS, la demostración de niveles de triptasa sérica $>20 \mu\text{g/L}$ no debe ser considerado como criterio menor de SM en pacientes con SM-AHNMD.

Una vez establecido el diagnóstico de SM de acuerdo a la aplicación de estos criterios, el grado de infiltración medular por MCs, la evaluación de otras poblaciones celulares hematopoyéticas de la MO, la presencia o ausencia de ciertos hallazgos relacionados con

la masa mastocitaria (criterios-B, *B-findings*) (**TABLA 5**) y la disfunción de órganos secundaria a su infiltración por MCs (criterios-C, *C-findings*) (**TABLA 5**) permiten subclasificar la SM en sus distintas variantes diagnósticas (p. ej., ISM, SSM, ASM, MCL y SM-AHNMD) (227,259,285,286,291,294,295). De este modo, la demostración de >20% de MCs en el aspirado medular y la presencia de otra hemopatía clonal asociada a la SM establece el diagnóstico de MCL y SM-AHNMD, respectivamente, mientras que la SSM y la ASM se distinguen de la ISM por la presencia de más de un criterio-B en ausencia de criterios-C en la SSM, y por el cumplimiento de al menos uno de los criterios-C en la ASM (**TABLA 5**).

1.2.5. ALTERACIONES GENÉTICAS EN LA MASTOCITOSIS

La naturaleza clonal de la mastocitosis viene determinada por la existencia de mutaciones del gen *KIT* que provocan la fosforilación constitutiva del receptor, favoreciendo así un estado de hiperactivación de Kit independiente de su unión a SCF (355). La activación continua de Kit da lugar a una expansión excesiva de MCs y una disminución del umbral necesario para su desgranulación, lo que determina la acumulación tisular de MCs y facilita la aparición de síntomas secundarios a la acción de los mediadores que liberan. La mutación de *KIT* más frecuente en la mastocitosis es, con diferencia, la mutación D816V, localizada en el dominio catalítico (exón 17) de la molécula, y detectable en más del 95% de los pacientes adultos con SM (176–178,356) y en una tercera parte de las mastocitosis pediátricas (180). A pesar de su estrecha asociación con SM, es importante resaltar que la mera presencia de la mutación D816V no determina el comportamiento clínico de la enfermedad, puesto que la mutación está presente en la inmensa mayoría de pacientes con ISM pero también en prácticamente todos los casos de SM avanzadas. Por este motivo, se ha sugerido que otras alteraciones genéticas y epigenéticas adicionales podrían estar involucradas en el desarrollo de un curso más agresivo, especialmente en la SM avanzada (311,314,357,358).

Más raramente se han descrito mutaciones de *KIT* diferentes a la mutación D816V, que pueden afectar tanto al exón 17 como a otros exones (**TABLA 3**). Estas mutaciones son infrecuentes en adultos (<5% de los casos) pero pueden llegar a detectarse en casi la

mitad de los pacientes pediátricos (180). Desde el punto de vista clínico, la localización específica de las mutaciones del gen *KIT* en la mastocitosis tiene una gran trascendencia terapéutica, ya que las mutaciones que afectan al dominio catalítico de la molécula (exones 13-18) provocan un cambio conformacional de su estructura que hace al MC resistente al efecto del inhibidor de TK imatinib (359,360), mientras que aquellas mutaciones que se localizan en los dominios transmembrana o yuxtamembrana de *KIT* (exones 9-11) son sensibles a dicho fármaco (182,194,196–199,360–362). Otra de las particularidades de las mutaciones localizadas fuera del dominio catalítico de *KIT* es que con cierta frecuencia son de naturaleza germinal, lo que determina la presencia de agregación familiar entre los pacientes portadores de este tipo de mutaciones (187,190,197,198,200,221,225).

En relación a las mutaciones de *KIT* en mastocitosis, cabe señalar también que el patrón de afectación de la hematopoyesis está directamente relacionado con el subtipo pronóstico de la enfermedad. Así, en las formas avanzadas de SM, como la ASM o la SM-AHNMD, la mutación de *KIT* afecta no solo al MC, sino también a otras poblaciones celulares hematopoyéticas de MO, incluyendo con relativa frecuencia tanto células mieloides como linfoides, reflejo de la afectación de una célula madre pluripotencial hematopoyética (363,364); por el contrario, la mayoría de las ISM presentan mutaciones de *KIT* restringidas al compartimento mastocitario (176,363,364). Ambos patrones moleculares están también directamente relacionados con el fenotipo mastocitario, de tal forma que, en comparación con los pacientes con mutación restringida al MC, en aquellos casos que presentan mutación multilineal, los MCs muestran niveles de expresión significativamente reducidos de proteínas de maduración como FcεRI, CD45 y proteasas citoplasmáticas (CPA y triptasa) (365), sugiriendo la existencia de un bloqueo madurativo (más) temprano del MC probablemente asociado a alteraciones genéticas adicionales.

En los últimos años ha habido un interés creciente por el estudio de alteraciones adicionales en genes diferentes de *KIT* que pudieran contribuir a explicar la gran heterogeneidad clínica de la mastocitosis, especialmente en lo que se refiere a su pronóstico. Así, en las formas avanzadas de SM se han descrito alteraciones adicionales que afectan, entre otros, a genes que han sido involucrados previamente en el desarrollo de otras hemopa-

tías clonales mieloides como *TET2* (310–312,314,366,367), *SRSF2* (311,313,358), *ASXL1* (310–312,358,367), *CBL* (310,311,367), *RUNX1* (311,358,367) y *RAS* (311,313,315). En términos globales, estas mutaciones afectan a título individual entre 15% y 35% de los pacientes con SM, siendo particularmente frecuentes en la ASM y la SM-AHNMD. Sin embargo, con frecuencia coexisten mutaciones de dos o más de estos genes en el mismo paciente, presentando alrededor del 80% de los pacientes con mastocitosis avanzadas más de tres mutaciones diferentes (310,311). Desde el punto de vista pronóstico, la supervivencia global de los pacientes que presentan este tipo de mutaciones adicionales es significativamente inferior a la de aquellos que presentan únicamente la mutación de *KIT*, especialmente cuando además de *KIT* están afectados los genes *ASXL1*, *RUNX1* y *SRSF2* (311,358). Todo ello sugiere que la mastocitosis es una enfermedad caracterizada por un evento genético común, la mutación de *KIT*, y que la existencia de mutaciones adicionales en otros oncogenes (ya sean mutaciones pre-existentes o adquiridas durante la evolución de la enfermedad) podría predisponer a un comportamiento clínico y pronóstico más agresivo de la misma.

1.2.6. TRATAMIENTO DE LA MASTOCITOSIS

Hoy día no existe un tratamiento curativo de la mastocitosis, y las estrategias terapéuticas actuales están dirigidas esencialmente a paliar o prevenir los síntomas relacionados con la activación mastocitaria (tratamiento antimedador) o a disminuir la masa mastocitaria (tratamiento citorreductor); no obstante, en los últimos años ha adquirido también gran protagonismo el empleo de fármacos con capacidad de inhibir de forma selectiva la actividad TK de Kit (tratamiento dirigido), de gran utilidad en casos seleccionados. En términos generales, la elección del tratamiento más adecuado en la mastocitosis varía en función de diferentes factores, entre los que se incluyen: la edad del paciente, la presencia o no de afectación cutánea, el tipo, frecuencia e intensidad de los síntomas de liberación de mediadores mastocitarios, la carga mastocitaria, la existencia de marcadores de mal pronóstico y las alteraciones moleculares detectadas.

En pacientes pediátricos, los niveles séricos de triptasa están claramente relacionados con el grado de extensión de la afectación cutánea y la intensidad de los síntomas derivados de la liberación de mediadores mastocitarios, como lo demuestra un estudio reciente sobre 111 niños con diferentes formas de mastocitosis (245). En dicho estudio, todos los casos que sufrieron episodios anafilácticos graves que requirieron tratamiento antimedador intensivo e ingreso en Unidades de Cuidados Intensivos, sistemáticamente presentaban afectación cutánea que involucraba >90% de la superficie corporal, y niveles de triptasa sérica incrementados, con una mediana de 30.8 µg/L. Estos hallazgos sugieren que los niveles séricos de triptasa en niños con mastocitosis serían un reflejo, no solo de la carga mastocitaria total, sino también del estado de activación mastocitaria global, reflejando así su aumento la necesidad de tratamiento antimedador crónico. La tendencia a la mejoría sintomática progresiva, junto a la eficacia del tratamiento antimedador y el riesgo de toxicidad de los fármacos citostáticos, apoyan la idea de evitar el tratamiento citorreductor en niños con mastocitosis, excepto en aquellos casos que muestran una elevada carga mastocitaria asociada a síntomas de liberación que puedan comprometer la vida del niño y que son refractarios al tratamiento antimedador intensivo y la fototerapia; en este caso, la administración de hidroxurea ha mostrado eficacia terapéutica en ausencia de efectos secundarios significativos (245).

En todos los pacientes adultos con CM, y en la mayoría de los que presentan ISM, la enfermedad muestra un curso crónico relativamente estable que habitualmente solo requiere de tratamiento antimedador. Paradójicamente, el riesgo de anafilaxia en pacientes adultos con SM parece guardar una relación inversa con la carga mastocitaria, siendo más frecuente en casos con ISM y niveles de triptasa sérica ligera a moderadamente elevados o incluso normales, respecto a ISM con mayor masa tumoral (246,368). Por el contrario, las SM avanzadas generalmente presentan complicaciones como consecuencia de fallo orgánico debido a una marcada infiltración tisular, asociándose a mal pronóstico a corto-medio plazo; por este motivo, habitualmente requieren de tratamiento citorreductor adaptado a cada subtipo de SM (288,292,293,369). A diferencia de lo que ocurre con las formas clásicas de mastocitosis, en la actualidad seguimos sin conocer en detalle el pro-

nóstico e implicaciones terapéuticas de otras variantes de la enfermedad de descripción más reciente como son la ISMs- y la WDSM.

De forma específica, el pronóstico de la SM-AHNMD, y por tanto su tratamiento, vienen determinados en gran medida por el tipo de hemopatía asociada y la naturaleza específica de la mastocitosis (p. ej., ISM *vs.* ASM). Dado que la mastocitosis se puede asociar a cualquier tipo de hematopatía clonal, pueden existir formas indolentes asociadas a hemopatías de mal pronóstico como LMA o SMD, en cuyo caso el tratamiento debe focalizarse en la enfermedad hematológica asociada, mientras que otros casos corresponden con formas avanzadas de mastocitosis como ASM o MCL, que pueden asociarse con hemopatías crónicas como la trombocitemia esencial o síndromes linfoproliferativos crónicos de bajo grado en los que el pronóstico estaría condicionado fundamentalmente por la mastocitosis. En cualquier caso, el tratamiento de la SM-AHNMD a menudo resulta complejo y suele requerir del tratamiento por separado de ambas enfermedades (227,288,307). La MML constituye una variante provisional de SM con un pronóstico especialmente adverso, similar al de la MCL, que por lo general requiere de tratamiento citorreductor intensivo, ya sea con quimioterapia o con trasplante de progenitores hematopoyéticos (336).

De todas las formas avanzadas de mastocitosis, la SSM es la que presenta mejor pronóstico, si bien éste puede ser variable; así, mientras que algunos casos muestran una progresión rápida a ASM, otros pacientes permanecen con enfermedad relativamente estable durante años o incluso décadas, sin signos o síntomas de disfunción orgánica, a pesar de tener una elevada carga mastocitaria (297,370,371). Este comportamiento clínico heterogéneo de la SSM hace que resulte con frecuencia difícil elegir el momento idóneo para iniciar tratamiento citorreductor. En este sentido, puede ser de utilidad la monitorización de parámetros bioquímicos como los niveles séricos de β_2 -microglobulina, cuyo aumento se asocia de forma sistemática a formas agresivas de la enfermedad, especialmente cuando se acompaña de niveles disminuidos de LDH (296), pudiendo constituir la combinación de ambos parámetros un indicador precoz de una posible transformación

a ASM, especialmente cuando se asocia a niveles progresivamente mayores de triptasa sérica (120,121,372).

Además del tratamiento específico de la enfermedad, el manejo de las mastocitosis incluye también el tratamiento de posibles complicaciones como son la pérdida de masa ósea y, en los casos asociados a anafilaxia por sensibilización al veneno de himenópteros, la inmunoterapia específica.

1.2.6.1. MANEJO DE LOS SÍNTOMAS DE LIBERACIÓN DE MEDIADORES MASTOCITARIOS

La gran mayoría de los pacientes con mastocitosis, independientemente del subtipo al que pertenecen, presentan en mayor o menor medida síntomas relacionados con la liberación de mediadores mastocitarios, ya sean locales o sistémicos, y que pueden cursar de forma más o menos crónica o episódica. El manejo general de los síntomas de activación mastocitaria en la mastocitosis debe incluir conductas que eviten la exposición a factores desencadenantes de activación mastocitaria y el uso racional de fármacos capaces de inhibir la producción, interferir con la liberación, bloquear los receptores específicos o antagonizar los efectos de los diferentes mediadores mastocitarios (373,374).

1.2.6.1.1. MEDIDAS PREVENTIVAS

Aunque los síntomas relacionados con la liberación de mediadores mastocitarios pueden aparecer en ausencia de una causa concreta identificable, con frecuencia se producen como consecuencia de la activación del MC por determinados factores desencadenantes (171,373,375–378) (**TABLA 4**). Por ello, uno de los pilares básicos del manejo de la mastocitosis consiste en evitar la exposición a aquellos factores que potencialmente puedan causar activación mastocitaria. Como regla general, los pacientes con mastocitosis deben evitar el calor ambiental, el agua caliente y los cambios bruscos de temperatura. En este sentido, es aconsejable utilizar dispositivos de aire acondicionado cuando sea necesario y emplear agua templada para el baño o la ducha. El roce o la fricción de las lesiones cutáneas de mastocitosis favorece la desgranulación mastocitaria y debe también evitarse,

especialmente en lesiones de gran tamaño (173,263). En los niños, las lesiones que afectan al cuero cabelludo son especialmente sensibles al roce (173), por lo que conviene tener especial precaución con los traumatismos en la cabeza y es recomendable evitar el secado del pelo con toalla, pudiendo utilizarse para ello un secador de pelo con temperatura regulable.

A diferencia de la asociación evidente entre una temperatura elevada o el roce de las lesiones cutáneas y la aparición de síntomas relacionados con activación mastocitaria, existe una gran variabilidad interindividual en cuanto a la aparición de síntomas relacionados con la exposición a otros posibles factores desencadenantes. Esta gran variabilidad responde a factores individuales, a la existencia de sensibilización previa frente a determinados alérgenos y a consideraciones geográficas (p. ej., diferencias en cuanto a la probabilidad de exposición a picaduras de insectos en áreas rurales frente a las áreas urbanas). Por todo ello, las medidas preventivas deben individualizarse lo máximo posible, fundamentalmente sobre la base de la existencia de reacciones previas a los diferentes (posibles) factores desencadenantes. A modo de ejemplo, dado el gran número de alimentos que potencialmente pueden inducir la liberación de mediadores mastocitarios, y la gran variabilidad entre distintos pacientes en cuanto a la tolerancia a los mismos, en cada paciente solo deben evitarse aquellos alimentos que hayan sido previamente implicados en la aparición de síntomas (379). Esto es particularmente relevante en los niños de cara a evitar posibles déficits nutricionales y asegurar un crecimiento y desarrollo normales. De forma similar, antes de permitir el empleo de medicamentos de uso común que potencialmente puedan desencadenar síntomas de liberación de mediadores mastocitarios en pacientes con mastocitosis, como los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) o fármacos que contienen codeína u otros derivados opiáceos, conviene investigar la tolerancia previa a dicho fármaco y, siempre que se considere necesario, la realización en el ámbito hospitalario de pruebas de provocación controladas. En pacientes que han presentado reacciones tras picadura de himenópteros se recomienda adoptar medidas generales para prevenir nuevas picaduras como son: evitar caminar descalzo por el césped, evitar ropas de colores llamativos, vestir camisa de manga larga y pantalones largos en zonas de riesgo, evitar el

uso de perfumes y colonias, o usar repelentes de insectos. En caso de precisar intervenciones o procedimientos de riesgo como son la administración de anestesia o de contrastes radiológicos iodados, deben emplearse protocolos de premedicación específicos (377).

Los pacientes con historia previa de episodios graves de liberación de mediadores mastocitarios, independientemente de su causa, deben llevar siempre consigo medicación de emergencia que incluya antihistamínicos H1 de acción rápida, corticosteroides y adrenalina autoinyectable, debiendo haber recibido previamente entrenamiento adecuado para su uso. Además, es recomendable que el paciente porte una pulsera o medalla donde se indique de forma clara que padece mastocitosis (373).

1.2.6.1.2. TRATAMIENTO ANTIMEDIADOR

Entre los fármacos antimedidores más comúnmente utilizados en la mastocitosis destacan el cromoglicato disódico, los antagonistas de los receptores de histamina H1 y H2, los antagonistas del receptor de LTs, los corticosteroides y la adrenalina. En casos seleccionados, el uso de inhibidores de los metabolitos del AA como la aspirina (380–382), o de inhibidores de la COX-2 como el celecoxib (383) puede ser muy eficaz para controlar determinados síntomas, siempre y cuando se haya demostrado tolerancia previa. Aunque algunos síntomas de liberación mastocitaria presentes en la mastocitosis pueden responder selectivamente a un determinado fármaco antimedidor, en ocasiones es necesaria una combinación de fármacos con diferentes mecanismos de acción para conseguir una respuesta terapéutica satisfactoria (373,384). Así, por ejemplo, mientras que el uso de antihistamínicos a demanda puede ser suficiente para pacientes con síntomas esporádicos leves, los pacientes que presentan episodios graves y recurrentes generalmente requieren de tratamiento crónico con diferentes combinaciones de fármacos antimedidores.

1.2.6.1.2.1. ANTIHISTAMÍNICOS

La histamina liberada por el MC juega un papel predominante en el desarrollo de síntomas relacionados con la activación mastocitaria. Los efectos clínicos de la histamina se producen como consecuencia de su interacción con los receptores H1, H2, H3 y H4, e incluyen vasodilatación, incremento de la permeabilidad vascular, la contracción del mús-

culo liso no vascular, el aumento de la secreción de las glándulas exocrinas y la estimulación del sistema nervioso periférico (115,116). Por tanto, los antihistamínicos constituyen medicamentos esenciales para el control de estos síntomas, debido a su capacidad para bloquear dichos receptores. En concreto, los antihistamínicos H1 han demostrado disminuir el prurito, el *flushing*, la urticaria, la taquicardia, la hipotensión y el dolor abdominal relacionados con procesos de desgranulación mastocitaria (385–388).

En general, en aquellos pacientes que requieren un tratamiento crónico se utilizan de manera preferencial antihistamínicos H1 no sedantes como la loratadina, fexofenadina o cetirizina, frente a los antihistamínicos H1 de primera generación, fundamentalmente por sus propiedades farmacocinéticas y su mejor perfil de tolerabilidad (373,389,390). Por el contrario, fármacos como la dexclorfeniramina o la difenhidramina, que son antihistamínicos H1 de acción rápida, constituyen los antihistamínicos de elección tanto para el tratamiento agudo de los episodios de liberación de mediadores mastocitarios (generalmente en combinación con corticosteroides y adrenalina), como para la prevención de la desgranulación mastocitaria en situaciones de riesgo (373,377).

Conviene tener en cuenta que algunos antihistamínicos H1 ejercen otros efectos además del bloqueo de los receptores H1, que pueden aportar beneficios adicionales en el tratamiento de la mastocitosis. Tal es el caso de antihistamínicos H1 de segunda generación como la desloratadina o el ketotifeno, que aparte de su actividad antiH1, han demostrado poseer propiedades estabilizadoras de la membrana del MC y, por lo tanto, de interferir además con la liberación de sus mediadores (391,392). En pacientes con mastocitosis que presentan depresión u otros trastornos cognitivos asociados, el uso de la doxepina, un antihistamínico H1 de primera generación, puede ser útil, debido a que también tiene efecto antidepresivo (373,384). Más recientemente, la rupatadina ha demostrado su efectividad clínica en la mastocitosis basado en su actividad antihistamínica H1 y antagonista del PAF (393), un mediador lipídico sintetizado y liberado por el MC activado y que se ha sido implicado en la génesis de episodios hipotensivos y de *flushing* en pacientes con mastocitosis (394).

En los pacientes que no logran un adecuado control sintomático con un solo fármaco antihistamínico, una estrategia eficaz consiste en la administración de un antihistamínico no sedante de larga duración durante el día, en combinación con un antihistamínico sedante por las noches (373,390). Además, el bloqueo selectivo de receptores H2 mediante el uso de antihistamínicos H2 como la ranitidina, cimetidina o famotidina, potencia el efecto antiH1 de los antihistamínicos H1, y puede resultar de utilidad en pacientes con episodios recurrentes y graves de liberación de mediadores mastocitarios (395). Aparte del efecto potenciador antiH1, los antihistamínicos H2 se utilizan también para tratar específicamente la hipersecreción gástrica y los síntomas de dispepsia que con relativa frecuencia presentan los pacientes con mastocitosis (384,396–398).

1.2.6.1.2.2. ANTAGONISTAS DE METABOLITOS DEL ÁCIDO ARAQUIDÓNICO

Los LTs y las PGs son potentes mediadores inflamatorios de naturaleza lipídica sintetizados *de novo* y liberados al medio extracelular por el MC activado; por lo tanto, los LTs y las PGs representan dianas terapéuticas en el manejo de los síntomas relacionados con la activación mastocitaria. Tanto los LTs como las PGs son generados mediante procesos de oxidación de residuos de AA presentes en la membrana fosfolipídica del MC, procesos que se llevan a cabo mediante la acción de las enzimas LO y COX, respectivamente (149). Los principales LTs liberados por el MC son el LTB₄, LTC₄, LTD₄ y LTE₄, cuyos principales efectos biológicos incluyen: la contracción del músculo liso, el incremento de la permeabilidad vascular, la estimulación de la secreción mucosa y el reclutamiento y activación de leucocitos.

Los antagonistas selectivos de los receptores de LTs como el montelukast han demostrado mejorar diferentes síntomas relacionados con la activación mastocitaria en algunos pacientes con mastocitosis, incluyendo de forma específica síntomas respiratorios, cutáneos, gastrointestinales y urinarios (399–401). De forma similar, la inhibición de la enzima LO con zileuton (no disponible en Europa) se ha asociado con una mejoría de síntomas neuropsiquiátricos y constitucionales en algunos pacientes (402). El principal metabolito generado por medio de COX es la PGD₂, un potente vasodilatador que ha sido implicado en la génesis del *flushing* y, posiblemente también la hipotensión, en pa-

cientes con mastocitosis. Tanto la aspirina como otros AINEs son capaces de bloquear de manera selectiva la enzima COX y por tanto, podrían ser eficaces en algunos pacientes para el tratamiento del *flushing* y de otras manifestaciones vasculares (380–383). Sin embargo, hay que tener en cuenta que eventualmente, estos fármacos pueden activar también los MCs e inducir su desgranulación (403,404), por lo que solo aquellos pacientes con historia de tolerancia previa serían candidatos potenciales a recibir este tipo de tratamiento.

1.2.6.1.2.3. ESTABILIZADORES DE LA MEMBRANA DEL MASTOCITO

El cromoglicato disódico es un estabilizador de la membrana del MC que ha sido empleado durante décadas en enfermedades alérgicas, tanto en aerosol como en solución oftálmica. El mecanismo de acción preciso del cromoglicato disódico no es bien conocido; no obstante, se ha sugerido que podría inhibir la exocitosis del MC inducida por GTP- γ -S y modular la función sensitiva de los nervios (405,406). A pesar de su limitada absorción a nivel intestinal (407), el cromoglicato disódico administrado por vía oral ha sido utilizado con eficacia en pacientes con mastocitosis, mejorando no solo los síntomas gastrointestinales como el dolor abdominal, los vómitos o la diarrea, sino también otras manifestaciones clínicas de la enfermedad como el picor, el *flushing*, el dolor óseo, la cefalea y algunos síntomas cognitivos (171,384,386,408). Además, la aplicación tópica de crema de cromoglicato en base acuosa sobre lesiones cutáneas de mastocitosis ha mostrado también eficacia para controlar las manifestaciones cutáneas de la enfermedad (171,384,409,410).

1.2.6.1.3. TERAPIA ANTI-INMUNOGLOBULINA E

El omalizumab es un anticuerpo monoclonal murino humanizado capaz de unirse de forma específica al receptor Fc ϵ RI presente en la membrana del MC, impidiendo así la interacción IgE-Fc ϵ RI. Hoy día es bien conocida la eficacia del omalizumab en el tratamiento de la urticaria crónica idiopática refractaria (411,412) y del asma bronquial (413,414); además, recientemente también se han descrito buenas respuestas de los síntomas relacionados con la liberación de mediadores mastocitarios (415–420), así como el control de reacciones derivadas de la administración de inmunoterapia específica frente

a veneno de himenópteros en varios pacientes con mastocitosis y enfermedades relacionadas con la activación mastocitaria (421–423). A pesar de ello, el tratamiento con omalizumab en pacientes con mastocitosis debe considerarse como excepcional, estando su uso restringido a pacientes seleccionados con síntomas graves, refractarios al tratamiento antimedador convencional.

1.2.6.1.4. FOTOTERAPIA CON RADIACIÓN ULTRAVIOLETA

Estudios *in vitro* han demostrado que la fototerapia con radiación ultravioleta A (UVA) empleando longitudes de onda comprendidas entre 340 y 400 nm (UVA1), sola o asociada a la administración de psoralén (PUVA), es capaz de interferir con la liberación de histamina por los MCs de la piel, e inducir su muerte por apoptosis en algunos pacientes (424–427). Llama la atención que dichos efectos parecen estar limitados a MCs activados, mientras que los MCs en reposo son resistentes al efecto de la radiación. De acuerdo con estas observaciones, la administración de fototerapia UVA1 en pacientes con mastocitosis ha demostrado disminuir el número de MCs en las lesiones cutáneas, atenuar el prurito cutáneo y los fenómenos de urticación local, e incluso mejorar, al menos temporalmente, la hiperpigmentación de las lesiones cutáneas de algunos pacientes (428,429). Más allá de su efecto local, se ha descrito también mejoría de síntomas sistémicos como diarrea y cefalea en adultos, y respuestas clínicas extraordinarias en niños con DCM que presentan episodios graves de liberación de mediadores mastocitarios (429,430). Estos hallazgos sugieren que los mediadores generados por los MCs activados de la piel pueden pasar a la circulación sistémica y ejercer su efecto en órganos y tejidos extracutáneos.

Las principales limitaciones para la administración de fototerapia con radiación UVA1 son su potencial riesgo carcinogénico en la piel, el daño ocular directo y la fotofibrosis. Dado que la administración de dosis intermedias de radiación UVA1 en pacientes con mastocitosis aparentemente muestra la misma eficacia que dosis elevadas (431), actualmente debería considerarse la administración de dosis intermedias como el régimen de elección debido a su menor toxicidad. En resumen, la fototerapia con radiación UVA1 puede ser útil en determinados pacientes con mastocitosis, particularmente en niños con

DCM y síntomas graves locales y/o sistémicos que no responden al tratamiento antiedificador convencional.

1.2.6.1.5. INMUNOTERAPIA FRENTE A VENENOS DE HIMENÓPTEROS

El veneno de himenópteros (abejas y avispas fundamentalmente) representa uno de los desencadenantes de anafilaxia más importantes en pacientes con mastocitosis (229,243,432). De hecho, la anafilaxia tras la picadura de estos insectos constituye la forma de presentación de la enfermedad en un número significativo de pacientes, particularmente entre aquellos que presentan ISMs-. En la mayoría de pacientes con SM asociada a anafilaxia inducida por veneno de himenópteros es posible demostrar la existencia de un mecanismo subyacente mediado por IgE mediante la positividad de pruebas cutáneas (*prick test* y/o intradermoreacción) y/o la demostración de la existencia en suero de anticuerpos IgE específicos frente al veneno responsable de la reacción; por este motivo, este grupo de pacientes son candidatos a recibir inmunoterapia específica (229,243,433).

Clásicamente se ha considerado que la mastocitosis podría ser un factor de riesgo para el desarrollo de reacciones adversas secundarias a la inmunoterapia. Sin embargo, el análisis retrospectivo de una serie de 201 pacientes incluidos en 10 estudios diferentes, mostró que la tasa de reacciones adversas a la vacuna es similar a la descrita en la población general (<20%) (434). Estas reacciones son más frecuentes durante la fase de inducción que en la de mantenimiento, especialmente cuando se utilizan protocolos de inmunoterapia tipo *rush*, por lo que actualmente se recomienda utilizar pautas convencionales de inmunoterapia específica (*cluster*) en pacientes con mastocitosis (435–437). En conjunto, cerca del 80% de los pacientes con mastocitosis que reciben inmunoterapia por presentar alergia a himenópteros alcanzan protección frente a nuevas picaduras (436,437), si bien se han descrito casos de reacciones fatales tras éstas, una vez suspendida la inmunoterapia (438). Por este motivo, la tendencia actual es mantener la inmunoterapia de forma indefinida en todos los pacientes con mastocitosis y alergia a veneno de himenópteros (379,433,434,436).

1.2.6.2. TRATAMIENTO CITORREDUCTOR

La gran heterogeneidad de las formas avanzadas de mastocitosis subsidiarias de tratamiento citorreductor, junto a la ausencia de estudios prospectivos en series de pacientes suficientemente amplias, y la falta de consenso entre distintos estudios en lo que respecta a los criterios de respuesta, condicionan que no exista un régimen terapéutico estándar para la mastocitosis avanzada. Las formas de SM en las que debe en principio plantearse tratamiento citorreductor incluyen: la ASM, la MCL, el MCS, la MML y algunos casos de SSM. Los fármacos citorreductores más empleados a tal efecto son el IFN- α , la cladribina y la hidroxiurea, todos ellos con frecuencia administrados en combinación con corticosteroides (287). Aunque ninguno de estos fármacos es capaz de lograr remisiones completas de la enfermedad, se han descrito respuestas objetivas con disminución de la carga mastocitaria y de la triptasa sérica de forma duradera (287,439–442), sobre todo en casos de SSM que muestran una progresión lenta a ASM (443). El principal factor limitante del tratamiento con fármacos citorreductores es la toxicidad de los mismos, especialmente la intolerancia al IFN- α (287) y la inmunosupresión asociada o no al desarrollo de tumores secundarios, relacionada con el uso de cladribina (442,444).

En pacientes con formas avanzadas de mastocitosis y enfermedad rápidamente progresiva, o en aquellos que son refractarios al tratamiento citorreductor convencional, puede ser necesaria la administración de tratamiento poliquimioterápico con regímenes idénticos a los empleados en la LMA secundaria, u otras terapias experimentales incluyendo el trasplante alogénico de precursores hematopoyéticos, especialmente en pacientes jóvenes con donante compatible (445,446). En los casos raros de MCS suele realizarse la exéresis del tumor siempre que ésta sea posible, generalmente en combinación con radioterapia y/o poliquimioterapia (188,330,332); a pesar de ello, el pronóstico de estos pacientes suele ser infausto con supervivencias de tan solo meses. Respecto a la mastocitosis de la SM-AHNMD, ésta debe tratarse de acuerdo al pronóstico propio del tipo de mastocitosis como si no existiera una hemopatía asociada (227,288,307), debiendo plantearse tratamiento citorreductor cuando la mastocitosis presenta un comportamiento agresivo; del mismo modo, la hemopatía asociada debe tratarse como si no existiera una mastocitosis

concomitante, con la excepción de la SM asociada a LMA, en cuyo caso la leucemia debe considerarse secundaria y, por tanto, debe ser tratada de acuerdo a protocolos dirigidos al tratamiento de leucemias de alto riesgo, incluyendo una intensificación con trasplante de progenitores hematopoyéticos (292).

Excepcionalmente, puede también plantearse tratamiento con IFN- α en variantes de mastocitosis que no presentan una carga mastocitaria elevada, en concreto como terapia de la osteoporosis severa secundaria y refractaria al tratamiento convencional (384,447).

1.2.6.3. TERAPIAS DIRIGIDAS A DIANAS MOLECULARES

Actualmente, es bien conocido que la presencia de la mutación D816V de *KIT* (y de otras mutaciones que afectan al dominio catalítico de esta molécula) confieren resistencia a imatinib (359–362), por lo que, a pesar de que se ha empleado este inhibidor de TK de forma indiscriminada, la mayoría de pacientes con mastocitosis no son candidatos a dicho tratamiento. Por el contrario, estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado la capacidad inhibitoria de imatinib en pacientes con mastocitosis que presentan *KIT* silvestre (333,448) o mutaciones fuera del dominio catalítico de *KIT* como la del419 en el exón 8 (187), o las mutaciones K509I (196–198) y p.A502_Y503dup en el exón 9 (194), la mutación F522C en el exón 10 (199) y la mutación V560G (361) en el exón 11.

Hoy día, imatinib es el único inhibidor de TK que cuenta con la aprobación por parte de la *Food and Drug Administration* (FDA) americana para su uso en mastocitosis, en concreto en el tratamiento de pacientes adultos con ASM que no presentan la mutación D816V o cuyo estado mutacional se desconoce. Otra indicación de imatinib en pacientes con mastocitosis corresponde a los casos de SM asociados a síndrome hipereosinofílico (SHE), leucemia eosinofílica crónica (CEL, abreviado del inglés: “*chronic eosinophilic leukemia*”) o leucemia crónica de basófilos y alteraciones de los genes *PDGFRA* o *PDGFRB*. En estos casos, la enfermedad cursa con eosinofilia persistente, generalmente muy marcada, con la posibilidad de desencadenar tanto disfunciones orgánicas por infiltración tisular, como procesos isquémicos en ausencia de afectación cutánea y de mutación de *KIT*.

Estos pacientes suelen alcanzar, como norma general, una remisión completa de ambos componentes de la enfermedad, el mastocitario y el eosinofílico (o basofílico), con dosis bajas de imatinib (p. ej., 100 mg/día) (449–453).

El uso de otros fármacos inhibidores de TK como nilotinib (454), dasatinib (445,455) o masitinib (456,457) ha sido también referido en series cortas y heterogéneas de pacientes con mastocitosis. Sin embargo, su eficacia en términos de respuesta objetiva de la enfermedad ha sido muy limitada. Más recientemente, otro inhibidor de TK, la midostaurina, ha demostrado una alta eficacia en el tratamiento de pacientes con SM avanzadas con una tasa de respuesta global de alrededor del 60% (458).

1.2.6.4. TRASPLANTE DE PRECURSORES HEMATOPOYÉTICOS

El trasplante de precursores hematopoyéticos en pacientes con mastocitosis se considera una terapia experimental reservada únicamente para pacientes con SM de mal pronóstico, refractarios a otros tratamientos. En un estudio retrospectivo de pacientes con mastocitosis sometidos a trasplante de precursores hematopoyéticos, en el que se incluyen un total de 57 pacientes, se ha referido una tasa de respuesta completa del 28% con una supervivencia global a 3 años del 57% y una tasa de mortalidad relacionada con el procedimiento a 6 meses y a 1 año del 11% y 20%, respectivamente (459). En este estudio, los factores asociados a una peor respuesta al trasplante fueron el diagnóstico de MCL y el empleo de acondicionamientos de intensidad reducida (459).

1.3. SÍNDROMES DE ACTIVACIÓN MASTOCITARIA

La acción de los diferentes mediadores liberados por los MCs activados desencadena una gran variedad de signos y síntomas que incluyen prurito, *flushing*, dolor abdominal, diarrea, hipotensión, taquicardia, cefalea, síntomas respiratorios y/o trastornos cognitivos, entre otras manifestaciones clínicas (460). Aunque la presencia de cualquiera de estos síntomas puede sugerir *a priori* una posible activación mastocitaria como mecanismo

fisiopatológico, su inespecificidad obliga a realizar un diagnóstico diferencial con otras posibles causas no relacionadas con la activación de los MCs. Entre otras, éstas incluyen el síndrome carcinoide, el feocromocitoma, el cáncer medular de tiroides, diversas enfermedades cardíacas, digestivas y respiratorias, y trastornos psiquiátricos, dependiendo de los síntomas predominantes en cada caso (461). Cuando el cuadro clínico es altamente sugestivo de activación mastocitaria con un perfil clínico y de laboratorio compatible, hay que tener presente que no todos los pacientes sufren un trastorno primario del MC, como ocurre por ejemplo en la SM. Tal es el caso de pacientes con anafilaxia idiopática y determinadas enfermedades de tipo alérgico en las que el cuadro clínico estaría determinado por la acción de mediadores liberados por el MC, sin que puedan demostrarse las alteraciones morfológicas, inmunofenotípicas o moleculares típicas de la SM. En otras ocasiones, el estudio de la MO permite detectar algunas de estas alteraciones, sin llegar a cumplirse los criterios suficientes para el diagnóstico de SM. Por lo tanto, existen diferentes entidades que pueden cursar con manifestaciones clínicas que se producen por la activación de MCs y que son similares a las observadas en pacientes con SM.

En los últimos años se ha acuñado el término de síndrome de activación mastocitaria (MCAS, abreviado del inglés: “*mast cell activation syndrome*”) para englobar a todos aquellos procesos que comparten como mecanismo fisiopatológico común la activación del MC, con la consiguiente liberación de mediadores mastocitarios y sus manifestaciones clínicas asociadas, independientemente de la demostración o no de la naturaleza clonal o reactiva del proceso. Como criterios diagnósticos de MCAS se han propuesto: 1) la presencia de síntomas episódicos de activación mastocitaria que afecten al menos a dos órganos o tejidos diferentes, 2) la demostración bioquímica del incremento de mediadores mastocitarios en sangre y/o en orina, y 3) la respuesta al tratamiento antimedador con antihistamínicos, antileucotrienos o estabilizadores de la membrana del MC (460,462) (**TABLA 7**).

TABLA 7. Criterios para el diagnóstico del síndrome de activación mastocitaria (MCAS).

1) Síntomas episódicos sugestivos de liberación de mediadores mastocitarios que afectan a ≥ 2 de los siguientes órganos:
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Piel: urticaria, angioedema, <i>flushing</i> ▪ Tracto digestivo: náuseas, vómitos, diarrea, dolor abdominal ▪ Aparato cardiovascular: síncope/presíncope hipotensivo, taquicardia ▪ Sistema respiratorio: sibilancias ▪ Tejidos naso-oculares: inyección conjuntival, picor, congestión nasal
2) Disminución de frecuencia/severidad o resolución de los síntomas con tratamiento antimedador como antihistamínicos H1 y H2, antagonistas de LTs o estabilizadores de la membrana del MC
3) Incremento de marcadores séricos y/o urinarios de activación mastocitaria durante los episodios:
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Incremento de triptasa sérica $\geq 20\%$ del valor basal + 2 $\mu\text{g/L}$ ▪ Aumento de metabolitos de histamina (metilhistamina) en orina ▪ Aumento de PGD2 o de 11β-PGF2α
4) Exclusión de causas primarias y secundarias de MCAS, y de entidades idiopáticas bien establecidas

Adaptado de las referencias (459,461).

MCAS, síndrome de activación mastocitaria; LT, leucotrieno; MC, mastocito; PGD2, prostaglandina D2; 11 β -PGF2 α , 11 β prostaglandina F2 α .

Desde el punto de vista etiopatogénico, los MCAS se han agrupado en tres categorías principales dependiendo de su causa: 1) MCAS primarios; 2) MCAS secundarios; y 3) MCAS idiopáticos (460,462) (**TABLA 8**).

Los MCAS primarios pueden definirse como aquellos MCAS que se producen por una alteración funcional originada en el propio MC, y que ocurre como consecuencia de la existencia de mutaciones somáticas de *KIT* que favorecen la autofosforilación constitutiva del receptor Kit, codificado por este gen. Esto genera un estado de hiperactivación capaz de desencadenar la desgranulación del MC mutado y la liberación de sus mediadores, con el consiguiente desarrollo de síntomas de activación mastocitaria. El ejemplo paradigmático de MCAS primario es la SM, aunque no todos los pacientes con SM muestran un comportamiento clínico de MCAS, sino que cursan con otras manifestaciones clínicas de la enfermedad, como lesiones cutáneas u osteoporosis, en ausencia de síntomas de liberación de mediadores. El otro subtipo de MCAS primario es el denominado

MCAS (mono)clonal (MMAS o c-MCAS, abreviados del inglés: “*monoclonal mast cell activation syndrome*” o “*clonal mast cell activation syndrome*”), una entidad mucho menos frecuente que la SM y que ha sido definida por la presencia únicamente de uno o dos criterios diagnósticos menores de SM, a excepción del incremento de triptasa sérica, que ya formaría parte de la propia definición del MCAS (461).

TABLA 8. Clasificación de los síndromes de activación mastocitaria (MCAS)

MCAS PRIMARIOS	Mastocitosis sistémica
	Síndrome de activación mastocitaria clonal (MMAS o c-MCAS)
MCAS SECUNDARIOS	Enfermedades alérgicas
	Enfermedades inflamatorias crónicas o neoplásicas
	Urticarias físicas
	Urticaria crónica autoinmune
MCAS IDIOPÁTICOS	Anafilaxia idiopática
	Angioedema idiopático
	Urticaria crónica idiopática
	MCAS idiopático

Adaptado de las referencias (459,461).

Los MCAS secundarios engloban un grupo amplio de procesos que se acompañan de activación del MC, ya sea mediante la unión de IgE a su receptor en la superficie de la célula, como ocurre en las enfermedades alérgicas, o a través de otros mecanismos no mediados por IgE como son la activación a través de IgG, complemento, componentes microbianos, drogas, hormonas, estímulos físicos y/o citoquinas. Este último mecanismo de activación mastocitaria no mediada por IgE, ocurre por ejemplo en algunas neoplasias, enfermedades inflamatorias crónicas, procesos autoinmunes, tras la toma de determinados fármacos como los derivados opiáceos y en la urticaria física.

Por último, en los MCAS idiopáticos no es posible identificar ningún factor intrínseco o extrínseco al MC que actúe como causa (objetiva) de los síntomas. Así, en este subgrupo de MCAS idiopáticos se incluyen una serie de procesos definidos por el tipo de síntomas predominantes, como son la urticaria idiopática, el angioedema idiopático y la anafilaxia idiopática, reservándose el término de MCAS idiopático de forma específica para aquellos pacientes que no pueden ser englobados en ninguna de las tres entidades anteriores.

Teniendo en cuenta esta clasificación, el diagnóstico de los diferentes subtipos de MCAS requiere además de los criterios diagnósticos generales antes referidos, la realización de un estudio de MO para descartar causas primarias, así como la exclusión de causas secundarias y de las entidades clínicas idiopáticas antes mencionadas.

Dado que el mecanismo por el que se producen los síntomas en los pacientes con MCAS es una excesiva activación mastocitaria, el tratamiento de cualquiera de los tipos de MCAS es el mismo que el descrito anteriormente en esta introducción para controlar los síntomas relacionados con la liberación de mediadores en pacientes con mastocitosis (463,464).

2. CAPÍTULO SEGUNDO

HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

Una de las mayores aportaciones de la clasificación actual de la OMS de la mastocitosis (166) es su capacidad para discriminar entre formas de buen y mal pronóstico. Sin embargo, el impacto pronóstico de esta clasificación sigue siendo limitado en cuanto a la identificación de aquellos pacientes que, a pesar de pertenecer a una categoría aparentemente de buen pronóstico (ISM), pueden progresar con el tiempo y desarrollar una forma avanzada de la enfermedad. Este tipo de evolución, aunque infrecuente a corto y medio plazo, es de enorme trascendencia dado el impacto negativo que tiene en la expectativa vital del individuo. Aunque se desconocen los mecanismos concretos que determinan la transformación de la enfermedad en estos casos, se ha postulado que ésta podría estar relacionada con la adquisición de mutaciones en diferentes oncogenes implicados en la proliferación y supervivencia celular. Por lo tanto, la identificación de factores de riesgo presentes ya durante la fase indolente de la enfermedad, que pudieran predisponer a la adquisición de estos nuevos defectos genéticos y, en consecuencia, al desarrollo de formas avanzadas de mastocitosis en el futuro, resulta crucial para un seguimiento clínico adecuado de estos pacientes y la instauración de medidas terapéuticas/preventivas de forma precoz.

En paralelo, a medida que ha ido avanzando el conocimiento sobre la mastocitosis y se han desarrollado nuevas técnicas diagnósticas para su estudio, se han identificado nuevas variantes de la enfermedad que presentan particularidades clínicas y/o biológicas únicas que les confiere entidad propia; entre estas variantes merece destacar la ISMs- y la WDSM. Esto es debido a que ambas entidades (ISM- y WDSM) probablemente constituyen las dos formas de SM en las que el diagnóstico puede pasar desapercibido con mayor facilidad, ya sea por una presentación clínica atípica, por la utilización de técnicas diagnósticas que no sean suficientemente sensibles y/o por las limitaciones de los actuales criterios diagnósticos de la OMS.

En la ISMs-, la ausencia sistemática de afectación cutánea y la inespecificidad de los síntomas que la acompañan, condicionan que la sospecha de mastocitosis se haya basado clásicamente en la demostración de niveles incrementados de triptasa sérica (229). Sin embargo, la triptasa basal puede estar elevada en pacientes sin ISMs- y puede ser nor-

mal en algunos casos que finalmente son diagnosticados de ISMs-, lo que apunta hacia la necesidad de criterios de sospecha clínicos adicionales para todos aquellos casos que cursan con síntomas sugestivos de liberación de mediadores mastocitarios en ausencia de las lesiones cutáneas típicas de mastocitosis. Por otro lado, con relativa frecuencia, los pacientes con ISMs- carecen de agregados de MCs en la biopsia de MO (criterio mayor de SM) y de niveles de triptasa sérica $>20 \mu\text{g/L}$ (uno de los criterios menores de SM), por lo que el diagnóstico solo puede establecerse mediante la demostración de los otros tres criterios menores de SM, basados en ciertas alteraciones citológicas, inmunofenotípicas y moleculares (465). Por este motivo, el estudio de la MO de estos pacientes debería ser realizado en centros con un nivel elevado de especialización, con profesionales cualificados y amplia experiencia en el diagnóstico de mastocitosis, mediante la aplicación de técnicas diagnósticas altamente sensibles con capacidad de detectar porcentajes muy bajos de MCs patológicos (p. ej., 10^{-5}) y que permitan, por lo tanto, un diagnóstico de certeza reduciendo la posibilidad de falsos negativos (466).

Con respecto a la WDSM, aunque la presencia de las lesiones cutáneas suele motivar la realización del estudio de MO en la mayoría de los pacientes (adultos), las características propias que definen esta variante de SM como son la morfología aparentemente normal del MC patológico bien diferenciado, la ausencia de expresión aberrante de alta intensidad de CD25 y CD2, y la ausencia de mutaciones en el codón 816 de *KIT* (tres de los criterios diagnósticos menores de SM) en la gran mayoría de los casos, determina que el diagnóstico de SM solo pueda establecerse de acuerdo a los criterios actuales de la OMS en aquellos casos que presentan agregados de MCs en MO y una triptasa basal elevada, como de hecho ocurre en la mayor parte de los casos de WDSM descritos anteriormente. Sin embargo, la demostración en los últimos años de la expresión alterada de ciertos marcadores en los MCs de MO de estos pacientes, incluyendo la expresión aberrante de CD30 (344) o la sobreexpresión de proteasas citoplasmáticas (304), sugiere la existencia de una enfermedad sistémica clonal en estos casos, muchos de los cuales serían (infra)diagnosticados de CM si se emplean de forma restrictiva los criterios diagnósticos de SM de la OMS (296). Por todo ello, el diagnóstico definitivo de WDSM requeriría de la

aplicación de criterios diagnósticos específicos, diferentes de los establecidos por la OMS para las SM convencionales.

En relación con estas dos nuevas variantes de SM mencionadas (ISMs- y WDSM), cabe señalar además que aún no se han podido establecer las implicaciones de un diagnóstico correcto de las mismas en cuanto a su pronóstico a largo plazo, y las implicaciones terapéuticas que éste podría condicionar.

Teniendo en cuenta todas estas consideraciones, en el presente trabajo nos planteamos **tres objetivos principales**:

- 1) Identificar factores pronósticos que permitan predecir la progresión y supervivencia de pacientes con ISM.
- 2) Caracterizar desde el punto de vista clínico y biológico la ISMs-, y determinar sus implicaciones pronósticas y terapéuticas.
- 3) Caracterizar desde el punto de vista clínico y biológico la WDSM, y determinar sus implicaciones pronósticas y terapéuticas.

3. CAPÍTULO TERCERO

MATERIALES, MÉTODOS Y RESULTADOS

En este apartado del trabajo doctoral incluiremos de forma específica los pacientes y muestras analizadas, los métodos empleados y los resultados obtenidos para cada uno de los tres objetivos planteados, mediante la inclusión de forma íntegra de los ocho trabajos (artículos originales) publicados en relación con cada uno de los mismos. Así, esta sección consta de los siguientes apartados:

En relación con el **PRIMER OBJETIVO** centrado en la identificación de factores pronósticos en pacientes con ISM se incluye el siguiente trabajo:

3.1 Título: Prognosis in adult indolent systemic mastocytosis: A long-term study of the Spanish Network on Mastocytosis in a series of 145 patients.

Autores: Luis Escribano*, **Iván Álvarez-Twose***, Laura Sánchez-Muñoz, Andrés García-Montero, Rosa Núñez, Julia Almeida, María Jara-Acevedo, Cristina Teodósio, Mónica García-Cosío, Carmen Bellas y Alberto Orfao.

*Ambos autores han contribuido de idéntica manera al trabajo y ambos deben ser considerados como primer autor del mismo.

Revista: *J Allergy Clin Immunol* 2009;124(3):514-521.

Respecto al **SEGUNDO OBJETIVO** que tenía como finalidad la caracterización clínica y biológica de la ISMs- y sus implicaciones pronósticas y terapéuticas, sus resultados se desglosan en los siguientes tres apartados:

3.2.1 Título: Clinical, biological and molecular characteristics of clonal mast cell disorders presenting with mast cell activation symptoms.

Autores: **Iván Álvarez-Twose***, David González-de-Olano*, Laura Sánchez-Muñoz, Almudena Matito, Maria Isabel Esteban-López, Arancha Vega, Maria Belén Mateo, Maria Dolores Alonso Díaz de Durana, Belén de la Hoz, Maria Dolores del Pozo Gil, Teresa Caballero, Ana Rosado, Isabel Sánchez Matas, Cristina Teodósio, María Jara-Acevedo, Manuela Mollejo, Andrés García-Montero, Alberto Orfao y Luis Escribano.

*Ambos autores han contribuido de idéntica manera al trabajo y ambos deben ser considerados como primer autor del mismo.

Revista: *J Allergy Clin Immunol* 2010;125(6):1269-1278.

3.2.2 Título: Validation of the REMA score for predicting mast cell clonality and systemic mastocytosis in patients with systemic mast cell activation symptoms.

Autores: Iván Álvarez-Twose, David González-de-Olano, Laura Sánchez-Muñoz, Matito A, María Jara-Acevedo, Cristina Teodósio, Andrés García-Montero, José Mário Morgado, Alberto Orfao y Luis Escribano.

Revista: *Int Arch Allergy Immunol* 2011;157(3):275-280.

- 3.2.3 Título:** Nonaggressive systemic mastocytosis (SM) without skin lesions associated with insect-induced anaphylaxis shows unique features versus other indolent SM.

Autores: Iván Álvarez-Twose, Roberta Zanotti, David González-de-Olano, Patrizia Bonadonna, Arancha Vega, Almudena Matito, Laura Sánchez-Muñoz, José Mário Morgado, Omar Perbellini, Andrés García-Montero, Giovanna De Matteis, Cristina Teodósio, Maurizio Rossini, María Jara-Acevedo, Donatella Schena, Andrea Mayado, Alberto Zamò, Manuela Mollejo, Paula Sánchez-López, Nieves Cabañes, Alberto Orfao y Luis Escribano.

Revista: *J Allergy Clin Immunol* 2013;133(2):520-528.

Finalmente, en relación con el **TERCER OBJETIVO** centrado en la caracterización clínica y biológica de la ISMs- y sus implicaciones pronósticas y terapéuticas, incluimos los siguientes cuatro trabajos:

- 3.3.1 Título:** Clinical, immunophenotypic, and molecular characteristics of well-differentiated systemic mastocytosis.

Autores: Iván Álvarez-Twose, María Jara-Acevedo, José Mário Morgado, Andrés García-Montero, Laura Sánchez-Muñoz, Cristina Teodósio, Almudena Matito, Andrea Mayado, Carolina Caldas, Manuela Mollejo, Alberto Orfao y Luis Escribano.

Revista: *J Allergy Clin Immunol* 2016;137(1):168-178.

- 3.3.2 Título:** Complete response after imatinib mesylate therapy in a patient with well-differentiated systemic mastocytosis.

Autores: Iván Álvarez-Twose, Pablo González, José Mário Morgado, María Jara-Acevedo, Laura Sánchez-Muñoz L, Almudena Matito, Manuela Mollejo, Alberto Orfao y Luis Escribano.

Revista: *J Clin Oncol* 2012;30(12):e126-129.

- 3.3.3 Título:** Imatinib in systemic mastocytosis: a phase IV clinical trial in patients lacking exon 17 KIT mutations and review of the literature.

Autores: Iván Álvarez-Twose, Almudena Matito, José Mário Morgado, Laura Sánchez-Muñoz, María Jara-Acevedo, Andrés García-Montero, Andrea Mayado, Carolina Caldas, Cristina Teodósio, Javier Ignacio Muñoz-González, Manuela Mollejo, Luis Escribano y Alberto Orfao.

Revista: *Oncotarget* 2016 (publicado online el 19 de Julio; doi:10.18632/oncotarget.10711; pendiente de transición al volumen definitivo).

3.3.4 Título: Complete response to gemtuzumab ozogamicin in a patient with refractory mast cell leukemia.

Autores: Iván Álvarez-Twose, Pilar Martínez-Barranco, Jason Gotlib, Andrés García-Montero, José Mário Morgado, María Jara-Acevedo, Jason D. Merker, Francisco Javier Peñalver, Almudena Matito, Yanli Hou, Laura Sánchez-Muñoz, Andrea Mayado, Manuela Mollejo, Luis Escribano y Alberto Orfao.

Revista: *Leukemia* 2016;30(8):1753-1756.

3.1. IDENTIFICACIÓN DE FACTORES PRONÓSTICOS EN PACIENTES CON ISM

3.1.1. PROGNOSIS IN ADULT INDOLENT SYSTEMIC MASTOCYTOSIS: A LONG-TERM STUDY OF THE SPANISH NETWORK ON MASTOCYTOSIS IN A SERIES OF 145 PATIENTS.

Luis Escribano*, **Iván Álvarez-Twose***, Laura Sánchez-Muñoz, Andrés García-Montero, Rosa Núñez, Julia Almeida, María Jara-Acevedo, Cristina Teodósio, Mónica García-Cosío, Carmen Bellas y Alberto Orfao.

*Ambos autores han contribuido de idéntica manera al trabajo y ambos deben ser considerados como primer autor del mismo.

J Allergy Clin Immunol 2009;124(3):514-521.

Prognosis in adult indolent systemic mastocytosis: A long-term study of the Spanish Network on Mastocytosis in a series of 145 patients

Luis Escribano, MD, PhD,^{a,*} Iván Álvarez-Twose, MD,^{a,*} Laura Sánchez-Muñoz, MD, PhD,^a Andres Garcia-Montero, PhD,^b Rosa Núñez, MD,^c Julia Almeida, MD PhD,^b Maria Jara-Acevedo, MSc,^b Cristina Teodósio, MSc,^b Mónica García-Cosío, MD, PhD,^d Carmen Bellas, MD, PhD,^e and Alberto Orfao, MD, PhD^b Toledo, Salamanca, and Madrid, Spain

Background: Indolent systemic mastocytosis is a group of rare diseases for which reliable predictors of progression and outcome are still lacking.

Objective: Here we investigate the prognostic impact of the clinical, biological, phenotypic, histopathological, and molecular disease characteristics in adults with indolent systemic mastocytosis, who were followed using conservative therapy.

Methods: A total of 145 consecutive patients were prospectively followed between January 1983 and July 2008; in addition, from 1967 to 1983, 20 patients were retrospectively studied.

Results: Multivariate analysis showed that serum β 2-microglobulin ($P = .003$) together with the presence of mast/stem cell growth factor receptor gene (*KIT*) mutation in mast cells plus myeloid and lymphoid hematopoietic lineages ($P = .02$) was the best combination of independent parameters for predicting disease progression (cumulative probability of disease progression of $1.7\% \pm 1.2\%$ at 5-10 years and of $8.4\% \pm 5.0\%$ at 20-25 years). Regarding overall survival, the best predictive model included age >60 years ($P = .005$) and development of an associated clonal hematological non-mast cell disorder ($P = .03$) with a cumulative probability of death of $2.2\% \pm 1.3\%$ at 5 years and of $11\% \pm 5.9\%$ at 25 years.

Conclusions: Indolent systemic mastocytosis in adults has a low disease progression rate, and the great majority of patients have a normal life expectancy, with the presence of *KIT* mutation in all hematopoietic lineages and increased serum β 2-microglobulin the most powerful independent parameters for predicting transformation into a more aggressive form of the disease. (J Allergy Clin Immunol 2009;124:514-21.)

Key words: Mastocytosis, indolent systemic mastocytosis, long-term prognosis

Mastocytosis is a group of heterogeneous diseases characterized by an abnormal expansion and accumulation of mast cells (MCs) in different tissues. In indolent systemic mastocytosis (ISM), the symptoms and signs of the disease are usually related to the release of MC mediators and, to a lesser extent, to the tissue MC burden. The clonal nature of mastocytosis can be established in virtually all cases through demonstration of gain-of-function mutations involving the tyrosine kinase domain of c-kit in lesional skin and/or bone marrow (BM) cells.¹⁻⁶ This and other disease features have been proposed as consensus criteria for the diagnosis and classification of different subtypes of mastocytosis.⁷⁻⁹ However, current knowledge about the prognosis of mastocytosis and the most useful predictors for patient outcome remains rather limited, particularly for the indolent forms of the disease. This is mainly because of the low prevalence of the disease and the lack of prospective studies in large series of patients with a long follow-up. Furthermore, depending on the distribution of different types of mastocytosis, major differences exist on overall survival (OS) rates between distinct series. Accordingly, several studies in which a relatively high percentage of systemic mastocytosis (SM) associated with other clonal non-MC lineage diseases (clonal hematologic non-mast cell disorders [AHNMDs]) were included¹⁰⁻¹² show that prognosis of such cases mainly depends on the associated AHNMD and/or the indolent versus aggressive nature of the mastocytosis;¹³ limited information is provided about the specific disease features that could be useful to predict outcome in ISM.

Here we investigate the prognostic impact of the clinical, biological, phenotypic, histopathological, and molecular characteristics of ISM in 145 consecutive adult patients who were diagnosed and followed using conservative therapy by the Spanish Network on Mastocytosis (REMA). Our results show that patients with ISM have a long life expectancy, and the best combination of independent predictors for disease progression is serum β 2-microglobulin levels and the presence of *D816V KIT* mutation in all hematopoietic lineages.

From ^aCentro de Estudios de Mastocitosis de Castilla La Mancha, Hospital Virgen del Valle, Toledo; ^bthe Department of Medicine and Cytometry and Hematology, Centro de Investigación del Cáncer (Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer [IBMCC]-Universidad de Salamanca Centro Superior de Investigaciones Científicas [CSIC]), University and University Hospital of Salamanca; ^cServicio de Hematología and ^dServicio de Anatomía Patológica, Hospital Ramón y Cajal, Madrid; and ^eServicio de Anatomía Patológica, Clínica Puerta de Hierro, Madrid.

*These authors have contributed equally to this work.

Supported by grants from the Ministerio de Sanidad y Consumo, Instituto de Salud Carlos III (REMA G03/007, FIS050769, FIS060529, FIS061377, and RETICS RD06/0020/0035-FEDER); Comunidad Autónoma de Madrid (GR/SAL/0133/2004), Junta de Castilla y León (Grant SAN196/SA10/07); Junta de Comunidades de Castilla La Mancha (FISCAM 2007/36); and Fundación MMA. A.G.-M. is supported by a grant from FIS/FEDER (CP03/00035) and C.T. from the FCT of Portugal (SFRH/BD/17545/2004).

Disclosure of potential conflict of interest: L. Escribano has written a brochure on tryptase for Phadia Spain. The rest of the authors have declared that they have no conflict of interest.

Received for publication January 9, 2009; revised May 4, 2009; accepted for publication May 5, 2009.

Available online June 22, 2009.

Reprint requests: Luis Escribano, MD, PhD, Centro de Estudios de Mastocitosis de Castilla La Mancha, Hospital Virgen del Valle, Carretera de Cobisa s/n, Toledo E-45071, Spain. E-mail: lescribanom@sescam.jccm.es.

0091-6749/\$36.00

© 2009 American Academy of Allergy, Asthma & Immunology

doi:10.1016/j.jaci.2009.05.003

Abbreviations used

AHNMD: Clonal hematologic non-mast cell disorder
 AML: Acute myeloblastic leukemia
 BM: Bone marrow
 ISM: Indolent systemic mastocytosis
 MC: Mast cell
 MDS: Myelodysplastic syndrome
 OS: Overall survival
 PB: Peripheral blood
 PFS: Progression-free survival
 REMA: Red Española de Mastocitosis
 SM: Systemic mastocytosis
 SSM: Smoldering systemic mastocytosis

METHODS**Patients**

A total of 145 consecutive patients with ISM, 63 men (43%) and 82 women (57%) with a median age at diagnosis of 37 years (16–72 years), who gave their informed consent to participate in this study according to the guidelines of the local ethical committees, were analyzed. Patients were prospectively followed at the REMA between January 1983 and July 2008. From 1967 to 1983, a total of 20 patients diagnosed with SM—as assessed by both skin and BM biopsy—were followed up in centers other than the REMA before referral and, thus, retrospectively studied. Patients were diagnosed and classified according to the classification and criteria used at the moment of initial diagnosis: from 1983 to 1991, cases were classified in nonaggressive versus aggressive forms^{14,15}; from 1991 to 2001, classification was made following the criteria established in a US workshop^{16,17}; finally, since 2001, World Health Organization guidelines for both diagnosis and classification,^{7,8} slightly modified with more recent criteria,⁹ were used. These later criteria were also retrospectively applied to all those patients whose diagnosis was made before 2001.

At the moment of referral to the REMA, and every 6 months, a complete clinical and physical work-up together with a routine peripheral blood (PB) count and differential and routine biochemistry were performed. Frozen serum samples from patients were available since 1993, and thus measurement of serum tryptase (CAP, Pharmacia Diagnostics, Sweden) was performed in all cases since 1993 on a 6-month basis. Furthermore, abdominal ultrasonography and/or computed tomography scan and bone densitometry x-ray of dorsal and lumbar vertebra and pelvis were also systematically performed when available at the hospital. The presence of either osteopenia or osteoporosis was defined following well established criteria^{18–20}; furthermore, the presence of patchy or diffuse bone sclerosis as assessed by x-ray of bones, computed tomography scan, and/or magnetic resonance imaging (when available at the hospital) was also recorded. Imaging studies were repeated every 2 years, except for cases with osteoporosis, in which follow-up studies were performed on a yearly basis. Skin biopsy samples were obtained in all cases showing cutaneous lesions, and skin sections were stained on a routine basis for hematoxylin-eosin and Giemsa, as well as for tryptase and/or c-kit using conventional immunocytochemical stains. In biopsies obtained before immunostaining for tryptase and c-kit was available, new sections from paraffin-embedded samples were cut and such stainings performed when they became standard practice. All samples were analyzed and reviewed by 3 independent experts (L.E., M.G.-C., and C.B.), strictly following the recently reported standards and recommendations.⁹ Diagnostic BM aspirate and biopsy were performed in 20 cases before referral to the REMA and at referral in all the remaining patients (n = 125); furthermore, in those patients whose BM study was performed before flow cytometry immunophenotypic analysis was available in 1992, a new BM study was performed. BM MC morphology was analyzed in all BM samples following previously defined criteria²¹; patient BM smears were stained by toluidine blue and May-Grünwald-Giemsa and analyzed by 3 independent observers (L.E., L.S.-M. and R.N.), in parallel with a total of 855 BM control samples, 57 of them corresponding to healthy subjects (data not shown). In addition, hematoxylin-eosin and Giemsa as well as tryptase and c-kit-stained patient BM sections were also studied and

evaluated by 3 independent observers (L.E., M.G.-C., and C.B.) following previous established criteria,^{22,23} in parallel with a group of 48 BM control samples. In 145 cases, immunophenotypic analysis of CD25 and/or CD2 expression on BM MC (and when present also in PB MC) was performed by using a multiparameter 4-color direct immunofluorescence technique according to consensus procedures and criteria previously defined by our group.^{24,25} From the 145 BM samples analyzed, 73 were studied in parallel in 2 different laboratories of the REMA for external quality control purposes. Detection of somatic activating codon Asp816 → Val *KIT* mutation (exon 17 of the *KIT* gene) or other *KIT* mutations was performed in genomic DNA^{6,26} from fluorescence-activated cell sorting–purified BM MCs (n = 95 cases); in addition, in 74 of these cases, *KIT* mutations were also analyzed, in other BM hematopoietic cell compartments (maturing neutrophil granulocytes, eosinophils, monocytes, lymphocytes, CD34⁺ cells, and nucleated red cells), by using highly purified, fluorescence-activated cell sorted cell populations as described elsewhere^{6,26} (purity of each cell fraction > 97%). Information about *KIT* mutation was prospectively available since 2002.

Treatment of patients included (1) careful counseling of patients and care providers; (2) avoidance of factors triggering acute mediator release and preventive measures in risk procedures such as general anesthesia and x-ray studies using contrast media, among others; (3) treatment of acute MC-mediator release including a training for self-administration of epinephrine in patients at risk for anaphylaxis; (4) treatment of chronic MC mediator release; and (5) availability of a 24-hour emergency system.

Treatment was carefully selected in each patient on the basis of the intensity and/or severity of clinical symptoms related to release of MC mediators. Different drugs (alone or in distinct combinations) were used following previously described criteria.^{27,28} Basically, therapy consisted of (1) MC stabilizers such as oral disodium cromoglycate, (2) scheduled or at-demand sedating H1 antihistamines (dexchlorpheniramine, hydroxyzine, and doxepin), and (3) scheduled or on-demand nonsedating H1 antihistamines depending on their availability throughout this study (cetirizine, levocetirizine, fexofenadine, ebastine, and desloratadine, among others), sometimes combined with a sedating antihistamine in highly symptomatic cases. In addition, other therapies were used for specific clinical situations; in cases with abdominal cramping and diarrhea unresponsive to disodium cromoglycate alone, nonsteroidal anti-inflammatory agents (ie, ibuprofen or aspirin) were used and, in nonresponders, short cycles of low doses of prednisone (0.3 mg/kg/d) with progressively decreasing doses were used. In stress-induced anaphylaxis, a psychiatric work-up was performed, and adequate sedation and/or antidepressant therapy were used. For patients with osteoporosis requiring therapy, calcium supplements, vitamin D, and oral bisphosphonates (alendronate or risendronate) were used, since they were available. Cytoreductive therapy in the absence of disease progression was used in 8 patients: (1) in 3 cases with severe osteoporosis and pathological fractures, IFN- α -2b alone (n = 1) or hydroxyurea followed by IFN- α -2b was used; (2) in 3 cases with severe MC mediator-related symptoms refractory to highly intensive antimedator therapy, either IFN- α -2b (n = 2) or hydroxyurea (n = 1) was used; and (3) in 1 patient who developed giant axillary mastocytomas, hydroxyurea was employed with a rapid response (Table 1). In addition, in 1 woman with advanced dilated cardiomyopathy, a heart transplant was performed in June 2006,²⁹ 12 years after the diagnosis of ISM, and she is still under immunosuppressive therapy with cyclosporine, mycophenolate mofetil, and deflazacort.

End points

The primary end points of the study were disease progression and OS as defined by transformation into a more aggressive subtype of mastocytosis according to the World Health Organization criteria^{7,8} (aggressive SM, SM-AHNMD, or MC leukemia) and death, respectively.

In addition, patients who developed biological changes in the absence of disease progression were recorded. Biological changes were defined by at least 1 of the following (previously absent) events: (1) sustained increase of serum tryptase levels above 200 ng/mL, which could not be explained by other conditions such as acute myeloblastic leukemia (AML), myelodysplastic syndrome (MDS), a subset of hyper eosinophilic

TABLE I. Cyto-reductive therapy in ISM in the absence of disease progression

Case no./sex	Time from diagnosis (mo)	Indication for therapy	Type of therapy	Duration of therapy (mo)	Response	Adverse event(s)	Time from end of therapy (mo)
1/M	238	OF	IFN- α -2b*	13	Yes	No	8
2/M	104	MRS	IFN- α -2b†	47	Yes	No	99
3/M	1	MRS	IFN- α -2b*	13	No	D	39
4/M	215	OF	IFN- α -2b*	12	Yes	No	106
5/M	39	BP	HU‡	2	No	LT	8
6/F	178	OF	HU‡	3	No	No	17
6/F	184	OF	IFN- α -2b*	4	Yes	D	10
7/F	416	Giant axillary mastocytomas	HU‡	12	Yes	No	19
8/F	49	MRS	HU‡	7	No	No	20

BP, Severe bone pain secondary to patchy bone sclerosis; D, depression; F, female; HU, hydroxyurea; LT, liver toxicity; M, male; MRS, severe mast cell mediator-related symptoms refractory to intensive antimediator therapy; OF, osteoporosis with pathological bone fractures.

*1.5 million U 3 times/wk.

†2 million U/d.

‡Dose adjusted in each case on the basis of peripheral blood cell counts.

syndromes, or diffuse bone sclerosis²⁷⁻³¹; (2) development of osteoporosis, diffuse or patchy bone sclerosis, or presence of a pathological bone fracture associated to severe osteoporosis; (3) appearance of organomegalies, as detected by imaging techniques, in the absence of an impaired organ function, not attributable to other pathological conditions, or skin mastocytomas; and (4) development of eosinophilia ($>0.5 \times 10^9/L$) and/or monocytosis ($>1 \times 10^9/L$) not attributable to pathological conditions other than mastocytosis.

Statistical analyses

The Mann-Whitney *U* and χ^2 tests were used to assess the statistical significance of differences observed between groups for continuous and categorical variables, respectively.

Overall survival and progression-free survival (PFS) curves were estimated according to the Kaplan-Meier method and survival curves compared with the log-rank test. A multivariate Cox proportional hazards model was constructed with those variables showing independent predictive value; inclusion in the final model was determined by a backward stepwise process. *P* values $\leq .05$ were considered to be associated with statistical significance. For all statistical analyses, SPSS 15.0 (SPSS, Chicago, Ill) was used.

RESULTS

Overall, the 145 patients included in this study were followed for 1526 person-years (median, 9 years; range, 2 months to 40 years) since confirmation of diagnosis by BM studies. The most relevant clinical, biological, morphological, immunophenotypic, and molecular characteristics of the patients analyzed are summarized in Table II.

Disease progression

Among the 145 patients analyzed, 5 (3%) showed progression to a more aggressive form of the disease (Table III) after a median follow-up from diagnosis of 147 months (range, 61-329 months): 1 patient developed an ASM 27 years after diagnosis; 3 patients developed an AHNMD corresponding to an MDS, AML, and polycythemia vera, 19, 12, and 5 years after diagnosis of mastocytosis, respectively; and the other patient with ISM showed evolution to MCL after 5 years. The cumulative probability of disease progression in ISM was $1.7\% \pm 1.2\%$ at 5 and 10 years, $3.8\% \pm 2.4\%$ at 15 years, and $8.4\% \pm 5.0\%$ at 20 and 25 years. In the

univariate analysis, the following variables showed an adverse impact on PFS: age >60 years at diagnosis ($P = .03$), presence of 1 or more cytopenias ($P = .02$), increased serum $\beta 2$ -microglobulin ($P = .003$), and presence of D816V *KIT* mutation in all hematopoietic lineages ($P = .02$; Table IV; Fig 1, A-C). Multivariate analysis showed that serum $\beta 2$ -microglobulin levels ($P = .003$) together with the presence of D816V *KIT* mutation in all hematopoietic lineages ($P = .02$) was the most powerful combination of independent prognostic factors to predict PFS.

Biological progression

Thirty-nine of 145 patients (27%) showed biological changes suggesting biological progression with a median time from diagnosis of 86 months (range, 6-382 months). The median age at biological progression was 47 years (range, 25-76 years). Biological progression consisted of an increase in serum tryptase—in the absence of diffuse bone sclerosis—above 200 ng/mL in 4 patients (10%), appearance of monocytosis in 1 case (3%) and eosinophilia in 2 patients (5%); development of osteoporosis, diffuse bone sclerosis, and patchy bone sclerosis were found in 22 (56%), 4 (10%), and 5 (13%) patients, respectively; 4 cases (10%) had pathological fractures related to severe osteoporosis; 6 (15%) and 8 (21%) patients developed hepatomegaly and splenomegaly, respectively. Finally, 1 patient (3%) developed cutaneous mastocytomas. In 11 of the 39 patients who showed biological progression (28%), 2 or more biological progression events coincided.

In turn, 2 patients with ISM developed a smoldering systemic mastocytosis (SSM) 224 and 382 months after diagnosis, respectively. Interestingly, both patients still remain alive without evidence of progression to a more aggressive category of the disease 53 and 66 months after development of SSM.

Survival

Until the moment of closing this study, 7 patients (5%) had died after a median follow-up of 8 years (range, 2 months to 27 years). Among these patients, death was directly related to the MC disorder in only 2 cases; 1 corresponded to a woman with D816V

TABLE II. Clinical and laboratory characteristics of patients (n = 145)

Variable	No. of cases (%)	Variable	No. of cases (%)
Male	63/145 (43)	Eosinophilia ($>0.5 \times 10^9/L$)	10/145 (7)
Age at diagnosis >60 y	8/145 (6)	Monocytosis ($>1.0 \times 10^9/L$)	1/145 (1)
Pruritus	119/145 (82)	Serum tryptase >20 ug/L	101/145 (71)
Flushing	81/145 (56)	Serum tryptase >200 ug/L	7/145 (5)
Anaphylaxis	33/145 (23)	Serum tryptase >200 ug/L [‡]	2/145 (1)
Peptic symptoms	29/145 (20)	Serum LDH >240 IU/L	46/145 (33)
Abdominal cramping	43/145 (30)	SAP >140 IU/L	7/145 (5)
Diarrhea	51/145 (35)	SAP >140 IU/L [§]	2/145 (2)
Neuropsychiatric symptoms*	34/145 (23)	$\beta 2$ -Microglobulin >2.5 mg/L	12/145 (9)
Skin lesions	131/145 (90)	Serum cholesterol <120 mg/dL	3/145 (2)
Hepatomegaly [†]	17/145 (12)	Serum vitamin B12 >1500 pg/mL	1/145 (1)
Splenomegaly [†]	12/145 (8)	Serum ferritin >200 ng/mL	11/145 (8)
Lymph node enlargement [†]	5/145 (3)	Abnormal BM MC morphology	131/145 (94)
Osteoporosis	26/145 (18)	Compact BM MC aggregates¶	119/145 (84)
Patchy bone sclerosis	6/145 (4)	Aberrant MC immunophenotype #	133/145 (98)
Diffuse bone sclerosis	9/145 (6)	Percentage of BM MC $\geq 1\%$ #	4/145 (3)
Osteolysis	3/145 (2)	Promastocytes**	1/145 (1)
Bone fracture	5/145 (3)	Circulating PB MC ^{††}	2/145 (1)
Anemia (Hb < 12 g/dL)	1/145 (1)	$>30\%$ BM MC infiltrate¶	5/145 (3)
Leukopenia ($<3.5 \times 10^9/L$)	1/145 (1)	D816V <i>KIT</i> mutation in MC	91/95 (96)
Platelets $<100 \times 10^9/L$	1/145 (1)	D816V <i>KIT</i> mutation in myeloid plus lymphoid cell lineages	7/74 (9.5)

LDH, Lactate dehydrogenase; SAP, Serum alkaline phosphatase.

Clinical and laboratory data in the table correspond to the first study available for each case.

*Decreased attention span, difficulty in concentrating, forgetfulness, irritability, depression, poor motivation, confusion, anger, anxiety, and sleepiness.

†As assessed by abdominal ultrasonography and/or computed tomography scan.

‡In the absence of diffuse bone sclerosis, because development of diffuse bone sclerosis is associated with a progressive increase in serum tryptase not related to MC burden.³¹

§In the absence of bone lesions.

||For details, see text.

¶In tryptase and c-kit-stained BM sections.

#As assessed by flow cytometry.

**Mast cells with bilobed or polylobed nuclei.²¹††The detection limit of $<1 \times 10^{-5}$ ($<0.001\%$).

KIT mutation in all hematopoietic lineages who developed a chemorefractory CD117⁺ AML and died 12 years after diagnosis of ISM; the second patient developed an MDS with CD117 D816V-blast cells and died 27 years after diagnosis of ISM (8 years after developing MDS; Table V). The remaining 5 patients died of causes apparently not related to mastocytosis 2 months and 1, 5, 8, and 21 years after diagnosis of ISM. The median age at death was of 71 years (range, 37-80 years; Table V).

In the univariate analysis, the following variables showed an influence on OS: age at diagnosis >60 years ($P < .001$), increased serum alkaline phosphatase ($P = .009$), increased serum vitamin B12 ($P = .001$), and development of an AHNMD ($P = .01$; Table VI). Multivariate analysis showed that the combination of independent variables with the highest predictive value for a shorter OS included age at diagnosis >60 years ($P = .005$), increased serum alkaline phosphatase ($P = .03$), and development of an AHNMD ($P = .03$; Table VI; Fig 1, D-G). The cumulative probability of death in patients with ISM was of $2.2\% \pm 1.3\%$ at 5 years, $3.4\% \pm 1.7\%$ at 10 years, $5.5\% \pm 2.7\%$ at 15 and 20 years, and $11\% \pm 5.9\%$ at 25 years.

DISCUSSION

In the current study, an in-depth analysis of prognosis and predictors of outcome is performed in a cohort of 145 adults with ISM and a long follow-up by using homogeneous criteria for patient diagnosis and conservative management at the REMA. In

contrast with most previously published series, which include relatively high percentages of poor prognosis forms of mastocytosis such as SM-AHNMD¹⁰⁻¹² or ASM,¹³ here only ISM adult cases were analyzed, allowing for the first time evaluation of long-term outcome of these patients after a median follow-up of 9 years.

From the prognostic point of view, our results show that despite the relatively high frequency of signs of biological progression, transformation of ISM to a more aggressive form of the disease was an infrequent event restricted to a minority of ISM cases. Of note, among patients with ISM, serum $\beta 2$ -microglobulin together with the presence of D816V *KIT* mutation in all hematopoietic lineages represented the best combination of independent parameters for predicting disease progression. To the best of our knowledge, this is the first report in which predictors of progression are identified for adult ISM. Despite this, a provisional subvariant of ISM considered to have a more aggressive behavior, SSM, has been defined recently.⁷⁻⁹ Interestingly, we found evolution of ISM to SSM to be rather infrequent and, despite previous reports,^{7,8} to have no clear impact on the prognosis of the disease, at least with the follow-up time reported here. Thus, our results indicate that in ISM, more attention should be paid to the presence of D816V *KIT* mutation in all hematopoietic lineages and serum $\beta 2$ -microglobulin. Interestingly, from 1995 to 2008, a total of 18 patients with ASM were referred to the REMA (data not shown), 13 of them with skin lesions; 9 of these 13 cases (70%) evolved from an ISM to ASM after a period of between 4 and 44 years

TABLE III. Demographics and disease-related parameters at diagnosis and at progression in those 5 patients who showed disease progression

Variable	Patient no.									
	1		2		3		4		5	
	Diagnosis	Progression	Diagnosis	Progression	Diagnosis	Progression	Diagnosis	Progression	Diagnosis	Progression
Age	56	62	33	61	64	70	51	70	25	37
Palpable hepatomegaly	No	Yes	Yes	Yes	No	Yes	No	No	No	No
Palpable splenomegaly	No	Yes	No	Yes	No	No	No	No	No	No
Lymphadenopathy*†	No	Yes	No	Yes	No	No	No	No	No	No
Bone lesion	No	DBS	O	O	No	No	O	O	No	No
Cytopenia(s)	No	Yes	No	No	No	No	Yes	Yes	No	Yes
Serum tryptase (ug/L)	52	1500	104	197	140	159	67	50.8	188	157
Serum β 2-M (ng/mL)	1.8	5.8	2.8	4.5	9.5	5.5	2.0	2.6	3.3	3.9
Vitamin B12 (pg/mL)	713	2,700	272	408	855	622	250	323	331	311
Promastocytes‡	Yes	Yes	No	Yes	No	No	No	No	No	Yes
>30% BM MC infiltrate	No	Yes	No	No	No	No	No	No	Yes	No
Multilineal D816V <i>KIT</i> mutation	M, L		M, L		M		No		M, L, blasts	
Time from diagnosis to progression (y)	5		27		5		19		12	
Biologic progression	Yes		Yes		No		No		No	
Type of disease progression	ISM to ASM		ISM to ASM		SM-AHNMD (PV)		SM-AHNMD (MDS)		SM-AHNMD (AML)	
Therapy after progression	IFN- α -2b, HU		IFN- α -2b, HU		HU		None		CT	
Death	No		No		No		Yes		Yes	
Time from progression (mo)	14		2		61		94		4	

ASM, Aggressive systemic mastocytosis; β 2-M, β 2-microglobulin; CT, chemotherapy; DBS, diffuse bone sclerosis; HU, hydroxyurea; L, lymphoid lineage; M, myeloid lineage; MDS, myelodysplastic syndrome; O, osteoporosis; PV, polycythemia vera.

* ≥ 2 cm as assessed by computed tomography scan and/or abdominal ultrasonography.

†Progressive abdominal lymphadenopathy (>4 cm).

‡Mast cells with bilobed or polylobed nuclei.²¹

TABLE IV. Univariate and multivariate analysis of prognostic factors associated with disease progression

Variable	Disease progression					
	Univariate analysis				Multivariate analysis	
	Percentage of cases	RR (CI)	P value		HR (CI)	P value
Age at diagnosis >60 y	Yes/no	20/5.7	13.18 (1.16-149.6)/1.00	.03		NS
Serum β 2-M* (ng/mL)		NA	1.65 (1.19-2.29)/1.00	.003	1.90 (1.24-2.92)/1.00	.003
Multilineal D816V <i>KIT</i> mutation†	Yes/no	60/5.8	8.01 (1.31-49.0)/1.00	.02	13.3 (1.42-123.8)/1.00	.02

NA, Not applicable; NS, not statistically significant ($P \geq .05$); RR, relative risk.

*Serum β 2-microglobulin (ng/mL; serum β 2-microglobulin did not show an impact on overall survival).

†In all hematopoietic lineages.

since the onset of skin lesions. Of note, in 8 of 8 cases studied, the *KIT* mutation was detected in BM MCs as well as all myeloid and lymphoid hematopoietic cell lineages, further supporting the stem cell origin of the disease^{4,32} and the relevance of the study of *KIT* mutations in all hematopoietic cell lineages^{6,26} as a predictor of outcome in ISM. Further studies investigating the potential association between multilineage involvement of myeloid and lymphoid cells^{4,6} and the positivity for the *KIT* mutation in PB leukocytes^{4,6} are required to determine whether the complex *KIT* mutational analyses of multiple cell populations performed in our study could be avoided.

Previous reports have suggested the occurrence of a frequent association between mastocytosis and other hematologic malignancies,^{33,34} and it has been speculated that patients with SM are at a high risk (10% to 30%) of developing myeloid malignancies.³⁵ In contrast, our experience suggests that such evolution should be considered an exceptional event in ISM. In our series, only 4 ISM cases developed a myeloid malignancy (an AML, an MDS, a polycythemia vera, and a MCL); of note, in those 2 cases developing AML and MCL, the D816V *KIT* mutation, apart from being present in MC, was also positive in highly purified CD34⁺ hematopoietic precursors, myeloid and lymphoid

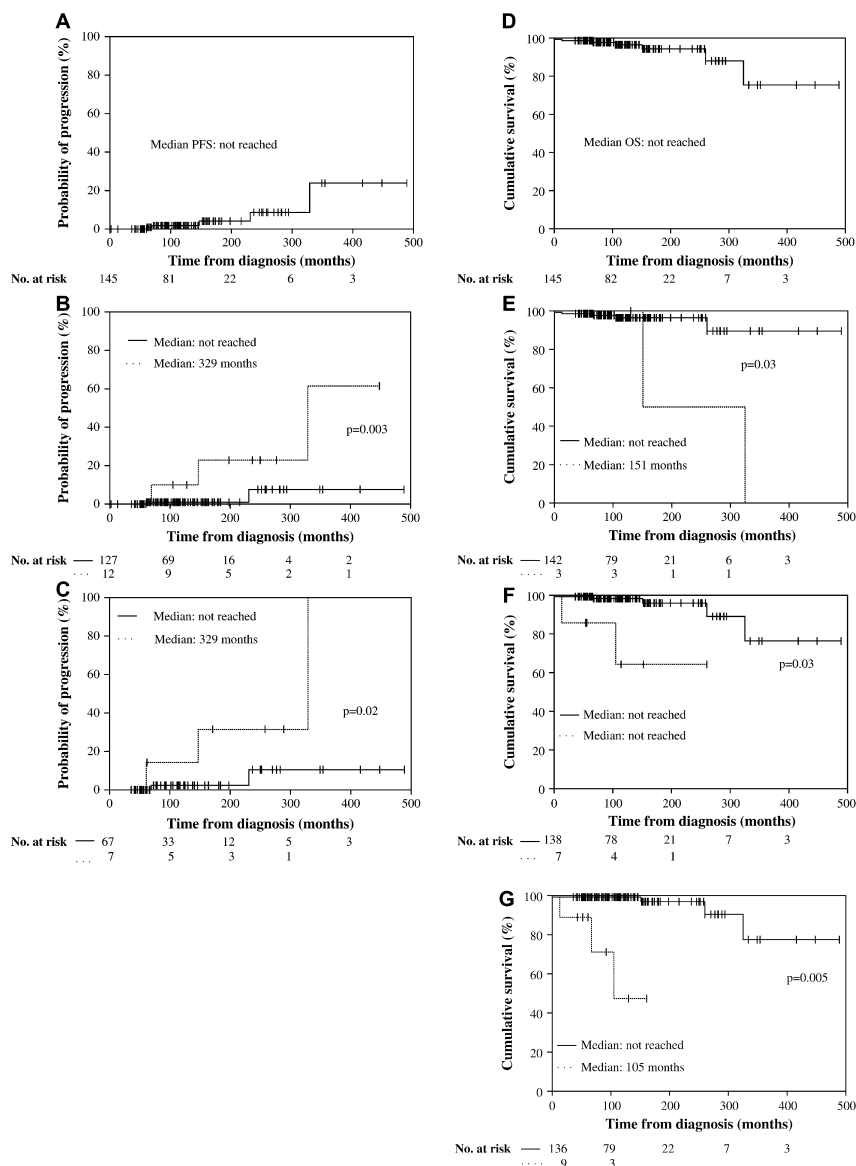


FIG 1. Progression-free survival (PFS) and overall survival (OS) in mastocytosis (n = 145). Panels A-C show PFS according to $\beta 2$ -microglobulin serum levels (— normal vsincreased) and presence (.....) vs absence (—) of D816V KIT-mutation in all hematopoietic lineages, respectively. Panels D-G show OS according to presence (.....) vs absence (—) of an AHNMD, increased (.....) vs normal (—) serum alkaline phosphatase and age at diagnosis >60 years (.....) vs <60 years (—), respectively.

TABLE V. Causes of death for individual patients

Patient characteristics	Patient no.						
	1	2	3	4	5	6	7
Sex	F	M	M	M	F	M	M
Age at diagnosis (y)	51	69	72	71	25	40	51
Disease progression	No	No	No	No	Yes	No	Yes
Cause of death	Breast cancer	Prostatic cancer	AMI	Septic shock	AML	AMI	MDS
Age at death	51	71	78	80	37	62	78
Time from diagnosis (mo)	2	13	67	105	151	260	325

AMI, Acute myocardial infarction; F, female; M, male.

TABLE VI. Univariate and multivariate analysis of prognostic factors associated with OS

Variable		OS				
		Univariate analysis			Univariate analysis	
		Percentage of deaths	RR (CI)	P value	HR (CI)	P value
Age at diagnosis >60 y	Yes/no	43/4	33.4 (5.40-206.5)/1.00	<.001	43.8 (3.08-621.6)/1.00	.005
Increased SAP*	Yes/no	29/4	9.73 (1.77-53.4)/1.00	.009	10.9 (1.24-95.1)/1.00	.03
Vitamin B12 >1500 pg/mL	Yes/no	17/0	53.2 (4.75-595.0)/1.00	.001		NS
Progression to AHNMD	Yes/no	29/1	8.48 (1.50-47.8)/1.00	.01	8.96 (1.12-71.8)/1.00	.03

NS, Not statistically significant ($P \geq .05$); RR, relative risk.

*Serum alkaline phosphatase >140 IU/L.

cells, suggesting the occurrence of D816V *KIT* mutations in all hematopoietic lineages in both patients, as sporadically mentioned in the literature for individual ISM cases evolving to a more aggressive subtype of the disease^{6,36-40}; however, to establish the impact of presence of D816V *KIT* mutation in all hematopoietic lineages as a predictor of outcome in ISM, longer follow-up of cases accomplishing this characteristic is mandatory.

In a retrospective study in which 58 proved cases of SM were analyzed, Travis et al¹¹ found only 46.5% to remain alive after a median follow-up of 7.6 years. In another study from the same institution in 40 SM cases (24 ISM and 16 ASM), 8 patients (20%) died (7 patients with ASM died of MS-related complications and 1 of an unknown cause), none corresponding to ISM cases.¹³ Among the patients studied here, only a minority ($n = 7/145$) of patients with ISM had died after a significantly longer follow-up than previously reported^{11,13}; moreover, in only 2 of these cases, death was directly related to mastocytosis because of development of an AML and MDS, respectively.

The specific subtype of mastocytosis, anemia, increased serum alkaline phosphatase, and the degree of BM involvement (as assessed by histopathology) have been previously identified as the most informative parameters for predicting OS of mastocytosis as a whole.^{11-13,41} Nevertheless, no specific information about the predictors of outcome in ISM is currently available. Here, we confirm the association of these parameters with OS of patients with ISM and show for the first time that from them, only age at diagnosis >60 years, increased serum alkaline phosphatase, and development of an AHNMD had independent predictive value for OS.

In summary, our results clearly show that patients with ISM treated with conservative therapy have both a low disease progression rate and long life expectancy, which should prevent

their recruitment to trials with cytoreductive or novel targeted drugs without appropriate selection of patients, on the basis of definitive signs of aggressiveness of disease; an exception could be those few patients with uncontrolled mediator-related symptoms and a clearly increased MC burden who may benefit in the future from well studied MC-targeting drugs with no potential mutagenicity. Because of the impact of the presence of D816V *KIT* mutations in all hematopoietic lineages on disease progression, careful follow-up is mandatory, particularly in patients with long disease duration.

Clinical implications: Patients with indolent systemic mastocytosis treated with conservative therapy have a normal life expectancy. The presence of *KIT* mutations in all hematopoietic lineages is strongly associated with disease progression and indicates the need for periodic follow-up.

REFERENCES

- Nagata H, Worobec AS, Oh CK, Chowdhury BA, Tannenbaum S, Suzuki Y, et al. Identification of a point mutation in the catalytic domain of the protooncogene *c-kit* in peripheral blood mononuclear cells of patients who have mastocytosis with an associated hematologic disorder. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:10560-4.
- Longley BJ, Tyrrell L, Lu SZ, Ma YS, Langley K, Ding TG, et al. Somatic *c-KIT* activating mutation in urticaria pigmentosa and aggressive mastocytosis: establishment of clonality in a human mast cell neoplasm. *Nat Genet* 1996;12:312-4.
- Longley BJ Jr, Metcalfe DD, Tharp M, Wang XM, Tyrrell L, Lu SZ, et al. Activating and dominant inactivating *c-KIT* catalytic domain mutations in distinct clinical forms of human mastocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:1609-14.
- Yavuz AS, Lipsky PE, Yavuz S, Metcalfe DD, Akin C. Evidence for the involvement of a hematopoietic progenitor cell in systemic mastocytosis from single-cell analysis of mutations in the *c-kit* gene. *Blood* 2002;100:661-5.
- Pardanani A, Reeder T, Li CY, Tefferi A. Eosinophils are derived from the neoplastic clone in patients with systemic mastocytosis and eosinophilia. *Leuk Res* 2003;27:883-5.

6. García-Montero AC, Jara-Acevedo M, Teodosio C, Sanchez ML, Nunez R, Prados A, et al. KIT mutation in mast cells and other bone marrow haematopoietic cell lineages in systemic mast cell disorders: a prospective study of the Spanish Network on Mastocytosis (REMA) in a series of 113 patients. *Blood* 2006;108:2366-72.
7. Valent P, Horny H-P, Escribano L, Longley BJ, Li CY, Schwartz LB, et al. Diagnostic criteria and classification of mastocytosis: a consensus proposal. *Leuk Res* 2001;25:603-25.
8. Valent P, Horny H-P, Li CY, Longley BJ, Metcalfe DD, Parwaresch MR, et al. Mastocytosis (mast cell disease). In: Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW, editors. *World Health Organization (WHO) classification of tumours: pathology & genetics: tumours of haematopoietic and lymphoid tissues*. Lyon, France: IARC Press; 2001. p. 291-302.
9. Valent P, Akin C, Escribano L, Fodinger M, Hartmann K, Brockow K, et al. Standards and standardization in mastocytosis: consensus statements on diagnostics, treatment recommendations and response criteria. *Eur J Clin Invest* 2007;37:435-53.
10. Horny HP, Parwaresch MR, Lennert AK. Bone marrow findings in systemic mastocytosis. *Hum Pathol* 1985;16:808-14.
11. Travis WD, Li CY, Bergstralh EJ, Yam LT, Sweet RG. Systemic mast cell disease: analysis of 58 cases and literature review. *Medicine* 1988;67:345-68.
12. Lawrence JB, Friedman BS, Travis WD, Chinchilli VM, Metcalfe DD, Gralnick HR. Hematologic manifestations of systemic mast cell disease: a prospective study of laboratory and morphologic features and their relation to prognosis. *Am J Med* 1991;91:612-24.
13. Pardanani A, Baek JY, Li CY, Butterfield JH, Tefferi A. Systemic mast cell disease without associated hematologic disorder: a combined retrospective and prospective study. *Mayo Clin Proc* 2002;77:1169-75.
14. Lennert K, Parwaresch MR. Mast cell and mast cell neoplasia: a review. *Histopathology* 1979;3:349-65.
15. Parwaresch MR, Horny HP, Lennert K. Tissue mast cells in health and disease. *Pathol Res Pract* 1985;179:439-61.
16. Metcalfe DD. Classification and diagnosis of mastocytosis: current status. *J Invest Dermatol* 1991;96:2S-4S.
17. Metcalfe DD. Clinical advances in mastocytosis: an interdisciplinary roundtable discussion. *J Invest Dermatol* 1991;96(suppl):1S-65S.
18. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis: report of a WHO Study Group. *World Health Organ Tech Rep Ser* 1994;843:1-129.
19. Kanis JA. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis: synopsis of a WHO report. *WHO Study Group. Osteoporos Int* 1994;4:368-81.
20. Miller PD. Guidelines for the diagnosis of osteoporosis: T-scores vs fractures. *Rev Endocr Metab Disord* 2006;7:75-89.
21. Sperr W, Escribano L, Jordan JH, Scherthaner GH, Kundi M, Horny H-P, et al. Morphologic properties of neoplastic mast cells: delineation of stages of maturation and implication for cytological grading of mastocytosis. *Leuk Res* 2001;25:529-36.
22. Horny HP, Sillaber C, Menke D, Kaiserling E, Wehrmann M, Stehberger B, et al. Diagnostic value of immunostaining for tryptase in patients with mastocytosis. *Am J Surg Pathol* 1998;22:1132-40.
23. Horny HP, Valent P. Diagnosis of mastocytosis: general histopathological aspects, morphological criteria, and immunohistochemical findings. *Leuk Res* 2001;25:543-51.
24. Escribano L, Orfao A, Diaz-Agustin B, Villarrubia J, Cervero C, Lopez A, et al. Indolent systemic mast cell disease in adults: immunophenotypic characterization of bone marrow mast cells and its diagnostic implications. *Blood* 1998;91:2731-6.
25. Escribano L, Diaz-Agustin B, López A, López RN, García-Montero A, Almeida J, et al. Immunophenotypic analysis of mast cells in mastocytosis: when and how to do it. *Proposals of the Spanish Network on Mastocytosis (REMA)*. *Cytometry* 2004;58B:1-8.
26. Sotlar K, Escribano L, Landt O, Möhrle S, Herrero S, Torrelo A, et al. One-step detection of c-kit point mutations using PNA-mediated PCR-clamping and hybridization probes. *Am J Pathol* 2003;162:737-46.
27. Sperr WR, Jordan JH, Baghestanian M, Kiener HP, Samorapoompichit P, Semper H, et al. Expression of mast cell tryptase by myeloblasts in a group of patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2001;98:2200-9.
28. Sperr WR, Stehberger B, Wimazal F, Baghestanian M, Schwartz LB, Kundi M, et al. Serum tryptase measurements in patients with myelodysplastic syndromes. *Leuk Lymphoma* 2002;43:1097-105.
29. Sperr WR, Hauswirth AW, Valent P. Tryptase a novel biochemical marker of acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma* 2002;43:2257-61.
30. Klion AD, Noel P, Akin C, Law MA, Gilliland DG, Cools J, et al. Elevated serum tryptase levels identify a subset of patients with a myeloproliferative variant of idiopathic hypereosinophilic syndrome associated with tissue fibrosis, poor prognosis, and imatinib responsiveness. *Blood* 2003;101:4660-6.
31. Kushnir-Sukhov NM, Brittain E, Reynolds JC, Akin C, Metcalfe DD. Elevated tryptase levels are associated with greater bone density in a cohort of patients with mastocytosis. *Int Arch Allergy Immunol* 2006;139:265-70.
32. Kocabas CN, Yavuz AS, Lipsky PE, Metcalfe DD, Akin C. Analysis of the lineage relationship between mast cells and basophils using the *c-kit* D816V mutation as a biologic signature. *J Allergy Clin Immunol* 2005;115:1155-61.
33. Travis WD, Li CY, Yam LT, Bergstralh EJ, Sweet RG. Significance of systemic mast cell disease with associated hematologic disorders. *Cancer* 1988;62:965-72.
34. Travis WD, Li C-Y, Bergstralh EJ. Solid and hematologic malignancies in 60 patients with systemic mast cell disease. *Arch Pathol Lab Med* 1989;113:365-8.
35. Sperr WR, Horny HP, Lechner K, Valent P. Clinical and biologic diversity of leukemias occurring in patients with mastocytosis. *Leuk Lymphoma* 2000;37:473-86.
36. Akin C, Fumo G, Yavuz AS, Lipsky PE, Neckers L, Metcalfe DD. A novel form of mastocytosis associated with a transmembrane c-kit mutation and response to imatinib. *Blood* 2004;103:3222-5.
37. Escribano L, García-Montero A, Núñez-López R, López-Jiménez J, Almeida J, Prados A, et al. Systemic mastocytosis associated with acute myeloid leukemia: case report and implications for disease pathogenesis. *J Allergy Clin Immunol* 2004;114:28-33.
38. Tang X, Boxer M, Drummond A, Ogston P, Hodgins M, Burden AD. A germline mutation in *KIT* in familial diffuse cutaneous mastocytosis - art. no. e88. *J Med Genet* 2004;41:NIJ89-93.
39. Hartmann K, Wardelmann E, Ma YS, Merkelbach-Bruse S, Preussner LM, Woolery C, et al. Novel germline mutation of *KIT* associated with familial gastrointestinal stromal tumors and mastocytosis. *Gastroenterology* 2005;129:1042-6.
40. Zhang LY, Smith ML, Schultheis B, Fitzgibbon J, Lister TA, Melo JV, et al. A novel K509I mutation of *KIT* identified in familial mastocytosis: in vitro and in vivo responsiveness to imatinib therapy. *Leuk Res* 2006;30:373-8.
41. Horan RF, Austen KF. Systemic mastocytosis: retrospective review of a decade's clinical experience at the Brigham and Women's Hospital. *J Invest Dermatol* 1991;96:5S-13S.

3.2. CARACTERIZACIÓN CLÍNICO-BIOLÓGICA DE LA ISMs- Y SUS IMPLICACIONES PRONÓSTICAS Y TERAPÉUTICAS

3.2.1. CLINICAL, BIOLOGICAL AND MOLECULAR CHARACTERISTICS OF CLONAL MAST CELL DISORDERS PRESENTING WITH MAST CELL ACTIVATION SYMPTOMS.

Iván Álvarez-Twose*, David González-de-Olano*, Laura Sánchez-Muñoz, Almudena Matito, María Isabel Esteban-López, Arancha Vega, María Belén Mateo, María Dolores Alonso Díaz de Durana, Belén de la Hoz, María Dolores del Pozo Gil, Teresa Caballero, Ana Rosado, Isabel Sánchez Matas, Cristina Teodósio, María Jara-Acevedo, Manuela Mollejo, Andrés García-Montero, Alberto Orfao y Luis Escribano.

*Ambos autores han contribuido de idéntica manera al trabajo y ambos deben ser considerados como primer autor del mismo.

J Allergy Clin Immunol 2010;125(6):1269-1278.

Food, drug, insect sting allergy, and anaphylaxis

Clinical, biological, and molecular characteristics of clonal mast cell disorders presenting with systemic mast cell activation symptoms

Iván Álvarez-Twose, MD,^{a,m,*} David González de Olano, MD,^{b,m,*} Laura Sánchez-Muñoz, MD, PhD,^{a,m} Almudena Matito, MD,^{a,m} María I. Esteban-López, MD,^c Arantza Vega, MD, PhD,^d María Belén Mateo, MD,^e María D. Alonso Díaz de Durana, MD,^f Belén de la Hoz, MD, PhD,^{g,m} María D. del Pozo Gil, MD, PhD,^h Teresa Caballero, MD,ⁱ Ana Rosado, MD,^f Isabel Sánchez Matas, MD,^j Cristina Teodósio, MSc,^{k,m} María Jara-Acevedo, MSc,^{k,m} Manuela Mollejo, MD, PhD,^l Andrés García-Montero, PhD,^{k,m} Alberto Orfao, MD, PhD,^{k,m,†} and Luis Escribano, MD, PhD^{a,m,†} Toledo, Madrid, Segovia, Guadalajara, Ciudad Real, Logroño, and Salamanca, Spain

Background: Systemic mast cell activation disorders (MCADs) are characterized by severe and systemic mast cell (MC) mediators-related symptoms frequently associated with increased serum baseline tryptase (sBt).

Objective: To analyze the clinical, biological, and molecular characteristics of adult patients presenting with systemic MC activation symptoms/anaphylaxis in the absence of skin mastocytosis who showed clonal (c) versus nonclonal (nc) MCs and to provide indication criteria for bone marrow (BM) studies.

Methods: Eighty-three patients were studied. Patients showing clonal BM MCs were grouped into indolent systemic mastocytosis without skin lesions (ISMs; n = 48) and other c-MCADs (n = 3)—both with CD25⁺⁺ BM MCs and either positive mast/stem cell growth factor receptor gene (*KIT*) mutation or clonal human androgen receptor assay (HUMARA)

tests—and nc-MCAD (CD25-negative BM MCs in the absence of *KIT* mutation; n = 32) and compared for their clinical, biological, and molecular characteristics.

Results: Most clonal patients (48/51; 94%) met the World Health Organization criteria for systemic mastocytosis and were classified as ISMs, whereas the other 3 c-MCAD and all nc-MCAD patients did not. In addition, although both patients with ISMs and patients with nc-MCAD presented with idiopathic and allergen-induced anaphylaxis, the former showed a higher frequency of men, cardiovascular symptoms, and insect bite as a trigger, together with greater sBt. Based on a multivariate analysis, a highly efficient model to predict clonality before BM sampling was built that includes male sex ($P = .01$), presyncopal and/or syncopal episodes ($P = .009$) in the absence of urticaria and angioedema ($P = .003$), and sBt $>25 \mu\text{g/L}$ ($P = .006$) as independent predictive factors.

Conclusions: Patients with c-MCAD and ISMs display unique clinical and laboratory features different from nc-MCAD patients. A significant percentage of c-MCAD patients can be considered as true ISMs diagnosed at early phases of the disease. (J Allergy Clin Immunol 2010;125:1269-78.)

Key words: Mast cell, mastocytosis, systemic mast cell activation disorders, anaphylaxis, clonal, CD25, *KIT* mutation, score

A wide variety of stimuli can trigger activation of mast cells (MCs) in allergic and nonallergic diseases. Cross-linking of FcεRI elicits the release of inflammatory mediators from MC secretory granules¹⁻³ in IgE-sensitized MCs. Moreover, release of MC mediators can also be elicited through Fcγ receptors,⁴⁻⁶ complement proteins,¹⁻³ or aggregated IgG and C3a.⁷ Furthermore, MCs express Toll-like receptors 4 and 2, CD48, and complement receptor 1,⁸⁻¹¹ which can activate MCs without requirements for antibody or other immunologic signalling.¹² Disorders characterized by an abnormal MC activation (MCADs) without clear triggers have been described^{13,14} and characterized by generalized pruritus, hives, flushing, tachycardia, abdominal pain, diarrhea, and/or syncopal or near-syncopal episodes. Elevated serum baseline tryptase (sBt) in patients with MCAD without evidence for systemic mastocytosis (SM) according to the World Health Organization (WHO) have been reported in some patients with recurrent MCAD.¹⁵

From ^aCentro de Estudios de Mastocitosis de Castilla La Mancha, Hospital Virgen del Valle, Toledo; ^bthe Allergy Unit, Hospital de Fuenlabrada, Madrid; ^cthe Allergy Department, Hospital General de Segovia; ^dthe Allergy Department, Hospital de Guadalajara; ^ethe Allergy Department, Hospital General de Ciudad Real; ^fthe Allergy Unit, Fundación Hospital Alcorcón, Madrid; ^gthe Allergy Department, Hospital Ramón y Cajal, Madrid; ^hthe Allergy Department, Complejo Hospitalario San Millán-San Pedro de La Rioja, Logroño; ⁱthe Allergy Department, Hospital La Paz, Madrid; ^jthe Allergy Department, Hospital Príncipe de Asturias de Alcalá de Henares, Madrid; ^kCentro de Investigación del Cáncer/IBMCC (USAL/CSIC), Departamento de Medicina and Servicio General de Citometría, University of Salamanca, Salamanca; ^lthe Pathology Department, Hospital Virgen de la Salud, Toledo; and ^mRed Española de Mastocitosis.

*These authors have contributed equally to this work.

†These authors have contributed equally to this work.

Supported by grants from the Ministerio de Sanidad y Consumo, Instituto de Salud Carlos III (FIS060529, FIS061377, PS09/00032, FIS09/90871, and RETICS RD06/0020/0035-FEDER); Junta de Castilla y León (Grant SAN196/SA10/07 and SAN/1778/2009); Junta de Comunidades de Castilla La Mancha (FISCAM 2007/36 and FISCAM 2008/46), and Fundación MMA. A.G.-M. is supported by a grant from FIS/ FEDER (CP03/00035) and C.T. from the FCT of Portugal (SFRH/BD/17545/2004).

Disclosure of potential conflict of interest: A. Rosado has received research support from the RIRAAF. The rest of the authors have declared that they have no conflict of interest. Received for publication August 24, 2009; revised January 13, 2010; accepted for publication February 18, 2010.

Available online May 3, 2010.

Reprint requests: Luis Escribano, MD, PhD, Hospital Virgen del Valle, Centro de Estudios de Mastocitosis de Castilla La Mancha, Planta 3ª, Carretera de Cobisa s/n, 45071 Toledo, Spain. E-mail: lescribanom@escam.jccm.es.

0091-6749/\$36.00

© 2010 American Academy of Allergy, Asthma & Immunology
doi:10.1016/j.jaci.2010.02.019

Abbreviations used

BM:	Bone marrow
c-MCAD:	Clonal mast cell activation disorder
ISM:	Indolent systemic mastocytosis
ISMs ⁻ :	Indolent systemic mastocytosis without skin lesions
ISMs ⁺ :	Indolent systemic mastocytosis with skin lesions
MC:	Mast cell
MCAD:	Mast cell activation disorder
nc-MCAD:	Nonclonal mast cell activation disorder
NSAIDs:	Nonsteroidal anti-inflammatory drugs
REMA:	Spanish Network on Mastocytosis
sBt:	Serum baseline tryptase
SM:	Systemic mastocytosis
WHO:	World Health Organization

Anaphylactic episodes are common in adults with SM (with or without skin involvement) and can be found at frequencies ranging from 22%¹⁶ to 49%.¹⁷ SM in the absence of skin lesions can be associated with aggressive categories of the disease, but indolent SM (ISM) in the absence of skin involvement (ISMs⁻) has been recognized since 1991.¹⁸ In recent years, the presence of clonal MCs in a subset of patients with idiopathic recurrent anaphylaxis has been reported^{9,20} (see also the Online Repository at www.jacionline.org) and named clonal MCAD (c-MCAD)²¹ or monoclonal MC activation syndrome.^{22,23} Interestingly, in c-MCAD, a lower incidence of both urticaria and angioedema has been reported during acute MC mediator release episodes.^{20,24} More recently, proposals and recommendations for an integrated diagnosis of MCAD and c-MCAD²¹ together with a series of MCAD associated with *Hymenoptera* sting anaphylaxis have been reported.²⁵ However, no study has been reported so far in which the clinicobiological features of patients presenting with systemic MC activation symptoms/anaphylaxis in the absence of skin mastocytosis have been prospectively analyzed in patients with clonal versus nonclonal MCs.

Here we describe the clinical, biological, and molecular characteristics of adult patients with symptoms suggesting a MC disorder in the absence of skin lesions with special emphasis on the differences found between patients with c-MCAD fulfilling criteria for ISM (ISMs⁻) versus nonclonal MCAD (nc-MCAD); in addition, we also investigate the differences between patients with ISMs⁻ and typical ISM patients with skin lesions (ISMs⁺). Our results indicate that patients with clonal disorders display unique clinical and laboratory features, and the vast majority correspond to ISMs⁻ patients whose diagnosis is made at an early phase of the disease with lower MC burden than ISMs⁺.

METHODS**Patient groups**

Adult patients referred to the Instituto de Estudios de Mastocitosis de Castilla La Mancha—the Clinical Reference Centre for the Spanish Network on Mastocytosis (REMA)—with severe and systemic symptoms attributable to MC mediators release episodes/anaphylaxis in the absence of mastocytosis-associated skin lesions, who gave their informed consent to participate in the study according to the local Ethics Committees (n = 91), were selected. Symptoms such as syncope, hypotension, cardiac arrest, dyspnea, abdominal cramping, diarrhea, generalized flushing, urticaria, angioedema, and headache, among others, were recorded. In addition, a control group of 114 patients with ISMs⁺ (28 of them with anaphylactic episodes) was analyzed.

A complete clinical work-up including careful cutaneous examination to rule out the presence of skin mastocytosis was systematically performed. Peripheral blood cell counts and differential, routine blood biochemistry, sBt (CAP; Phadia Diagnostics, Uppsala, Sweden), total serum IgE, and vitamin B12 were studied in all patients. After a careful clinical work-up was performed and the suspected triggers were identified (eg, *Hymenoptera* sting, drugs, or food, among others) a complete allergy study was performed, including specific IgE (Immuno CAP; Phadia Diagnostics) and skin tests—skin prick test and/or intradermoreaction—as previously described.¹⁶ Skeletal x-ray survey and abdominal ultrasonography or computed tomography scan were performed in all patients, whereas dual energy x-ray absorptiometry was performed in 62 patients. The presence of osteoporosis was defined following well established criteria^{26–28}; the presence of bone sclerosis, as assessed by skeletal x-ray survey and/or computed tomography scan, was also recorded.

Morphologic, immunophenotypic, and molecular studies of bone marrow mast cells

In all patients, a complete bone marrow (BM) study was performed strictly following recently proposed criteria.²³ BM biopsy was performed at the outpatient consultation, and patients were premedicated with dexchlorpheniramine, ranitidine, and diazepam 1 hour before the procedure; in 1 patient, BM biopsy was performed at the intensive care unit because of a previous history of stress-induced anaphylaxis; BM MC morphology was analyzed in toluidine blue and May-Grünwald-Giemsa stained smears²⁹; BM sections stained for hematoxylin-eosin, Giemsa, reticulin, tryptase, and c-kit were analyzed.^{30,31} For both cytologic and histologic studies, all samples were analyzed and reviewed by 3 independent experts (L.E., I.A.-T., M.M.).

Immunophenotypic analysis of CD25 expression on BM MCs was performed by flow cytometry using a multiparameter 4-color immunofluorescence technique according to consensus procedures and criteria previously defined by the REMA.^{32,33} Presence of a double MC population (CD25⁺ and CD25⁻ MC) was defined when >1% CD25⁺ MCs were detected within the overall BM MC compartment. In addition, 70 of 83 BM samples were studied in parallel in 2 different laboratories of the REMA for external quality control purposes.

Detection of somatic activating codon Asp816 → Val *KIT* mutation or other *KIT* mutations was performed in genomic DNA from fluorescence-activated cell sorting–purified populations of BM MCs, neutrophils, eosinophils, monocytes, lymphocytes, CD34⁺ hematopoietic progenitor and precursor cells, and nucleated red cells, as described elsewhere.^{34,35} To evaluate clonality, the pattern of inactivation of chromosome X was studied by the HUMARA assay³⁶ in 2 women lacking *KIT* mutations.

Definitions

According to previous reports,^{13,15,37} MCAD was defined as the presence of clinical symptoms attributable to MC mediators release independently of biological demonstration of MC activation through, for example, increased sBt levels. All 83 patients studied fulfilled these criteria.

Clonality was defined on the basis of the presence of both *KIT*-mutated MCs (or a clonal HUMARA test in women lacking *KIT* mutation) and aberrant CD25 expression on BM MCs. Those patients lacking both criteria were considered nonclonal. Patients having CD25^{bright+} expression with negative (n = 1) or not evaluable (n = 4) *KIT* mutation, or those carrying *KIT* mutation with a normal MC immunophenotype (n = 3), even if they had elevated sBt, were excluded from the study. According to such criteria, 51 patients were subclassified as having ISMs⁻ or other c-MCAD and 32 as having nc-MCAD, and 8 were excluded from the study. All ISMs⁺ showed CD25^{bright+} expression in association with *KIT* mutation.

Anaphylaxis was defined following previous published criteria^{38,39}; accordingly, those patients with symptoms involving ≥2 organs and those having severe cardiovascular involvement—for example, reduced blood pressure, syncope, and/or cardiac arrest (even in the absence of other organ-related symptoms)—were considered to have anaphylaxis. Both the clinical characteristics of acute MC mediators release episodes and MC-related symptoms in between them were recorded (Table 1).

TABLE I. Clinical and laboratory features of patients in between the acute episodes

	nc-MCAD (n = 32)	P value	ISM ^s (n = 48)	P value	ISM ^s (n = 114)
Male	10/32 (31)	<.001	35/48 (73)	.001	52/114 (46)
Age at onset*	39 (15-65)	NS	41 (18-76)	<.001	28 (0-66)
Age at diagnosis†	53 (19-70)	NS	48 (18-77)	.01	41 (21-79)
Follow-up from onset‡	86 (13-386)	NS	67 (8-332)	<.001	158 (42-497)
Follow-up from diagnosis‡	12 (2-53)	.01	22 (2-95)	.01	40 (2-148)
Pruritus	11/32 (34)	NS	12/48 (25)	<.001	89/112 (79)
Flushing	10/32 (31)	NS	14/48 (29)	.01	57/112 (51)
GI symptoms	5/32 (16)	NS	9/48 (19)	.01	43/112 (38)
Neuropsychiatric§	2/32 (6)	NS	2/48 (4)	NS	8/112 (7)
Organomegaly	0/32 (0)	NS	5/48 (10)	NS	19/114 (17)
Osteoporosis¶	2/20 (10)	NS	10/42 (24)	NS	16/102 (16)
Diffuse bone sclerosis#	0/32 (0)	NS	2/48 (4)	NS	10/114 (9)
Total IgE (KU/L)	62.9 (1-553)	NS	33.2 (5-596)	NS	28 (2.3-195)††
Specific IgE	12/27 (44)	NS	25/44 (57)	NS	6/12 (50)††
Tryptase (μg/L)	15.4 (2.7-30)	<.001	25.2 (6.8-515)	NS	40.2 (5.6-644)
Eosinophils >0.5 × 10 ⁹ /L	0/32 (0)	NS	2/45 (4)	NS	5/113 (4)
Cytopenia**	1/32 (3)	NS	3/48 (6)	NS	3/114 (3)
Vitamin B12 >1500 pg/mL	0/27 (0)	NS	0/43 (0)	NS	7/103 (7)
Cholesterol <120 mg/dL	1/32 (3)	NS	0/47 (0)	NS	4/112 (4)
Triglycerides <40 mg/dL	2/32 (6)	NS	0/45 (0)	NS	4/112 (4)

Results expressed as number of patients/total patients studied (percentage) for categorical variables and median (range) for continuous variables. Both clinical and laboratory data included in the table correspond to the first study available in each patient.

GI, Gastrointestinal; NS, not statistically significant.

*Date of the first MC mediators release episode or appearance of skin lesions.

†Date of BM study.

‡In months.

§Irritability, lost of concentration, severe sleep disturbances.

||As assessed by computed tomography scan and/or abdominal ultrasonography.

¶As assessed by dual-energy x-ray absorptiometry following WHO guidelines.

#As assessed by radiograph and/or computed tomography scan.

**Hemoglobin <10 g/dL and/or leukocytes <1 × 10⁹/L and/or platelets <100 × 10⁹/L.

††In the subset of patients with ISM with anaphylaxis (n = 28).

Statistical methods

For all continuous variables, median and range were calculated, whereas for categorical variables, frequencies were reported. The Mann-Whitney *U* and the χ^2 tests were used to assess the statistical significance of differences observed between groups for continuous and categorical variables, respectively. To identify the best combination of independent factors associated with each subgroup of patients, a multivariate (logistic regression) analysis was performed. For multivariate analyses, only those variables that showed statistically significant differences in the univariate study were selected. *P* values ≤.05 were considered to be associated with statistical significance. For all statistical analyses, the SPSS 15.0 statistical software package (SPSS, Chicago, Ill) was used.

RESULTS

Diagnostic criteria for systemic mastocytosis

A total of 83 adults, 37 women (45%) and 46 men (55%) with a median age of 49 years (range, 18-77 years) who were referred to the REMA from April 2001 to January 2009, were studied. After careful analysis of BM samples, 51 (61%) patients were found to have both CD25^{bright+} MCs and either *KIT* mutation (n = 50; the D816V *KIT* mutation in 47 patients and the D816Y, D816H, and Ins815-816 *KIT* mutational changes in 1 patient each) or a clonal HUMARA test (n = 1), and they were categorized as c-MCAD. The remaining 32 patients (39%) showed a normal MC immunophenotype and neither *KIT* mutation nor clonal MCs, and they were classified as having nc-MCAD.

Except for increased sBt, no other major or minor criteria for SM were found in nc-MCAD. In contrast, 48 of 51 clonal patients

(94%) fulfilled either 1 major and ≥1 minor (67%) or ≥3 minor criteria (33%) for SM, and they were classified as ISMs⁺; conversely, another 3 patients who fulfilled only 2 minor criteria (CD25^{bright+} and *KIT* mutation) could not be classified as having SM and were categorized as having c-MCAD. All patients with ISMs⁺ fulfilled the WHO criteria for SM. MC aggregates were found in 80% of patients. Interestingly, ISMs⁺ patients showed a higher frequency of lymphoid aggregates (*P* = .005), BM fibrosis (*P* = .006), and lesions constituted by an admixture of MCs, eosinophils, and lymphocytes (*P* < .001) and greater percentages of BM MCs (*P* < .001) versus nc-MCAD (Table II). Furthermore, no differences regarding BM MC percentages were found between nc-MCAD (median, 0.007; range, <0.0001-0.2) and those 3 patients of c-MCAD (median, 0.002; range, 0.0007-0.03) that did not fulfill the WHO criteria for SM. In turn, the only significant differences between ISMs⁺ and ISMs⁻ patients were a lower frequency of BM fibrosis (*P* = .02) and a higher frequency of patients showing coexistence of normal CD25⁻ and aberrant CD25⁺ BM MCs (double MC population) as assessed by flow cytometry (*P* = .02), among the former group (Table II); similarly, no significant differences were detected between ISMs⁻ and the other 3 clonal MCAD patients not fulfilling the criteria for SM. Of note, the frequency of *KIT* mutations involving hematopoietic cell lineages other than MC was significantly higher among ISMs⁺ versus ISMs⁻ (22% vs 6%; *P* = .01; Table II).

Overall, patients with ISMs⁻ showed similar clinical and laboratory features to those of patients with nc-MCAD except for a higher frequency of men (*P* < .001) and increased sBt

TABLE II. Morphologic, immunophenotypic, and molecular characteristics of patients

	nc-MCAD n = 32	P value	ISMs ⁻ n = 48	P value	ISMs ⁺ n = 114
BM MC aggregates [†]	0/31 (0)	<.001	30/45 (67)	NS	90/112 (80)
Hypercellularity [†]	0/31 (0)	NS	5/44 (11)	NS	21/110 (19)
Lymphoid aggregates [†]	3/31 (10)	.005	17/44 (39)	NS	57/109 (52)
BM fibrosis [†]	1/31 (3)	.006	12/43 (28)	.02	53/110 (48)
BM sclerosis [†]	0/31 (0)	NS	2/43 (5)	NS	15/109 (14)
Abnormal BM MCs [‡]	0/31 (0)	<.001	46/46 (100)	NS	107/111 (96)
Myelodysplasia [‡]	2/31 (6)	NS	3/45 (7)	NS	4/111 (4)
BM eosinophilia [‡]	10/31 (32)	NS	22/45 (49)	NS	45/112 (40)
MEL lesions [‡]	0/30 (0)	<.001	23/45 (51)	NS	64/111 (58)
Aberrant BM MCs [§] phenotype [§]	0/32 (0)	<.001	48/48 (100)	NS	114/114 (100)
Double BM MC population [§]	0/32 (0)	<.001	16/48 (33)	.02	20/113 (18)
BM MCs (%) ^{§#}	0.007 (0-0.2)	<.001	0.09 (0.0006-0.5)	NS	0.1 (0.003-1.47)
Positive <i>KIT</i> mutation	0/32 (0)	<.001	47/48 (98)	NS	114/114 (100)
Multilineal <i>KIT</i> mutation [¶]	0/32 (0)	<.001	3/47 (6)	.01	24/106 (23)

Results expressed as number of patients/total patients studied (percentage) or as #median (range). Clinical and laboratory data included in the table correspond to the first study available in each patient. MEL, Lesions constituted by an admixture of MCs, eosinophils, and lymphocytes.

[†]In tryptase-stained BM sections.

[‡]In May-Grünwald-Giemsa-stained BM smears.

[§]As assessed by flow cytometry.

[#]Coexistence of immunophenotypically normal (CD25⁺) and aberrant (CD25⁺) BM MCs.

[¶]Detection of *KIT* mutation involving BM MCs and other BM cell lineages.

($P < .001$) (Table I). In turn, differences between patients with ISMs⁻ and ISMs⁺ included male predominance ($P = .001$), older age at both disease onset ($P < .001$) and diagnosis ($P = .01$), and a lower frequency of pruritus ($P < .001$), flushing ($P = .01$), and gastrointestinal symptoms ($P = .01$) among the former group (Table I).

Clinical findings

After a median follow-up of 71 months (range, 8-386 months), a total of 162 acute MC mediators release episodes were recorded in 70 patients, whereas the remaining 13 patients had a countless number of episodes, with no significant differences between ISMs⁻ and nc-MCAD patients (Fig 1, A). Overall, the most common triggers for acute episodes of MC mediators release were insects ($n = 44$; 53%), including wasp ($n = 30$), bee ($n = 10$), both wasp and bee ($n = 1$), horsefly (*Hippobosca equina*; $n = 1$), and unidentified insects ($n = 2$). In 36 of 83 (43%) patients (88% of the 41 cases triggered by *Hymenoptera* sting), *Hymenoptera* sting was the only trigger identified: 27 corresponded to ISMs⁻ and 2 to c-MCAD, and 7 were nc-MCAD patients. Drug reactions were found in 16 patients (19%), 5 with ISMs⁻ and 11 with nc-MCAD, to antibiotics ($n = 6$)—amoxicillin ($n = 3$), penicillin ($n = 1$), streptomycin and teicoplanin ($n = 1$), and fosfomycin ($n = 1$)—and nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in 5—metamizole ($n = 2$), aspirin ($n = 1$), aspirin and naproxen ($n = 1$), and ibuprofen ($n = 1$). Two patients experienced episodes triggered by both NSAIDs and betalactams, and the remaining 3 drug-induced cases included reactions triggered by codeine ($n = 1$), mepivacaine ($n = 1$), and rocuronium ($n = 1$). Among the drug reactions, 15 were immediate (≤ 2 hours after contact with the trigger), and 1 caused by NSAIDs was delayed 8 hours after contact with the trigger. Other triggers were fish ($n = 4$), peach ($n = 1$), egg and sunflower oil ($n = 1$), orange candy ($n = 1$), alcohol ($n = 1$), and intestinal manipulation during abdominal surgery ($n = 1$). Twenty-nine patients (35%) were classified as idiopathic because no identifiable cause was found. In 24

of 33 patients (73%) with a single MC mediators release episode, this was caused by insects, whereas those patients having >5 episodes ($n = 17$) were mainly idiopathic (53%) or triggered by mixed causes (47%); in 16 of 50 patients (32%) with ≥ 2 episodes, each episode was caused by a different trigger.

According to the final diagnosis (Fig 1, B), insects were the most common trigger among patients with ISMs⁻ (65% vs 31% in nc-MCAD; $P = .003$), whereas drug-induced MC mediators release was characteristic of the nc-MCAD group (34% vs 10% among ISMs⁻ patients; $P = .009$), with almost half of these latter patients showing idiopathic MC mediators release. Among the 3 patients of c-MCAD, 2 were triggered only by insects and 1 by both insects and fish.

Sixty-six patients (80%), 21 of them corresponding to nc-MCAD, had life-threatening cardiovascular and/or respiratory symptoms, whereas 17 (20%) presented with other severe MC mediator-related symptoms. Regarding the clinical symptoms of the most severe episode, significantly higher frequencies of skin (urticaria and/or angioedema; $P < .001$) and respiratory (dyspnea; $P = .005$) symptoms were found among nc-MCAD versus ISMs⁻, whereas cardiovascular (presyncope, $P = .001$; syncope, $P = .001$) symptoms were more frequently found among the latter group (Fig 2, Fig E1); in contrast, similar frequencies were detected for each individual symptom between patients with ISMs⁻ and ISMs⁺ with anaphylactic reactions (data not shown). Interestingly, no differences were found among nc-MCAD patients regarding severity of acute episodes between patients displaying increased ($n = 23$) versus normal ($n = 9$) sBt: respiratory compromise (74% vs 67%), presyncope (35% vs 56%), syncope (39% vs 44%), hypotension (30% vs 33%), and cardiac arrest (0% vs 11%), respectively. In addition, when comparing ISMs⁻ patients with *Hymenoptera* sting as the only trigger ($n = 27$) with other ISMs⁻ patients ($n = 21$), a greater predominance in men ($P = .005$), together with a lower frequency of recurrent acute episodes ($P < .001$) and both flushing and gastrointestinal symptoms during acute episodes ($P < .001$) as well as in between them ($P = .006$), was found among the former group; in contrast,

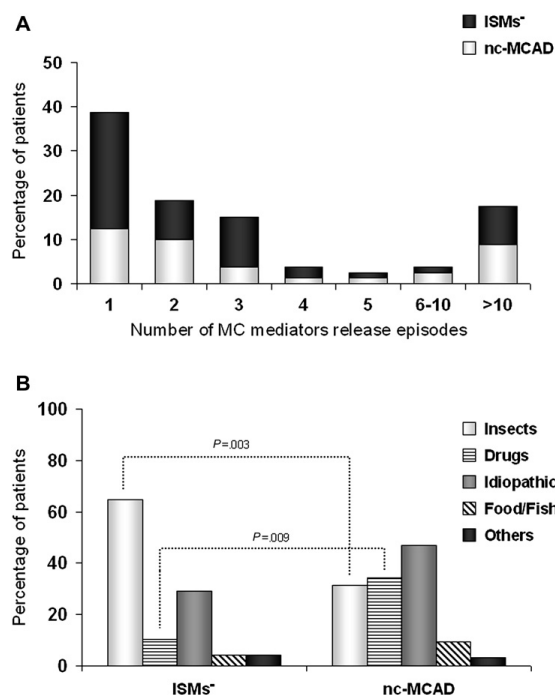


FIG 1. Distribution of nc-MCAD and ISMs⁺ patients (n = 80) according to the number of acute episodes after a median follow-up before the referral of 71 months (8-386 months; **A**) and the frequency of different triggers for the release of MC mediators (**B**) in ISMs⁺ (n = 48) vs nc-MCAD (n = 32). No statistically significant differences regarding the median follow-up were found between clonal and nonclonal patients. In contrast, the median (range) follow-up of patients with a single MC mediators release episode was significantly lower ($P < .001$) than that of patients with >1 episode: 44 months (8-380 months) vs 103 months (13-386 months).

no differences ($P > .05$) regarding bone loss were found (61% vs 63%, respectively).

Overall, anesthetic procedures were carried out in 25 patients; anaphylactic episodes developed in 3 patients, including 2 of 13 nc-MCAD (triggered by rocuronium and mepivacaine, respectively), 1 of 11 patients with ISMs⁺ who had a cardiac arrest related to gastrointestinal manipulation during a laparotomy, and 0 of 1 c-MCAD.

Interestingly, 4 of 28 (14%) patients with ISMs⁺ with anaphylactic reactions had MC mediators release episodes at 12, 14, 19, and 32 months before the development of skin lesions and diagnosis of ISM. Three of them were idiopathic, and 1 was a result of an IgE-mediated amoxicillin reaction.

Serum tryptase levels

Median sBt was significantly higher ($P < .001$) among patients with ISMs⁺ versus nc-MCAD. In line with this, sBt $<15 \mu\text{g/L}$ and $<11.5 \mu\text{g/L}$ were found in only a minority of all clonal patients—5 (10%) and 2 (4%), respectively—but in a significant proportion of all patients with nc-MCAD—15 (47%) and 9 (28%), respectively ($P < .001$ and $P = .005$, respectively), whereas sBt $>25 \mu\text{g/L}$ was seen in 24 (50%) and 4 (12%) ISMs⁺ and nc-MCAD patients,

respectively ($P = .001$). An increased frequency of ISMs⁺ versus nc-MCAD was found among patients with sBt levels $>20 \mu\text{g/L}$ —35 (78%) versus 10 (22%), respectively—and a lower incidence of ISMs⁺ versus nc-MCAD among patients with sBt levels $<20 \mu\text{g/L}$ —13 (37%) versus 22 (63%), respectively ($P < .001$). No significant differences were found in sBt levels of patients with ISMs⁺ showing *Hymenoptera* sting as the only trigger versus other ISMs⁺ patients. The 3 c-MCAD patients showed sBt levels of $9.5 \mu\text{g/L}$, $12.8 \mu\text{g/L}$, and $14.3 \mu\text{g/L}$, respectively.

Allergy study

A complete allergic work-up was made in 74 patients (CAP, n = 24; skin test, n = 1, both, n = 49). In 40 patients (54%), an underlying IgE-mediated mechanism responsible for acute episodes was demonstrated, with no significant differences ($P > .05$) between patients with ISMs⁺ and nc-MCAD (57% vs 44% of positive tests, respectively). In addition, an IgE-mediated mechanism was detected in all 3 c-MCAD patients (two patients with hymenoptera sting anaphylaxis and one patient with hymenoptera sting anaphylaxis associated with fish allergy).

Specific IgE was found in 35 of 41 (85%) cases triggered by *Hymenoptera* sting, mostly corresponding to ISMs⁺ (n = 23; 66%)

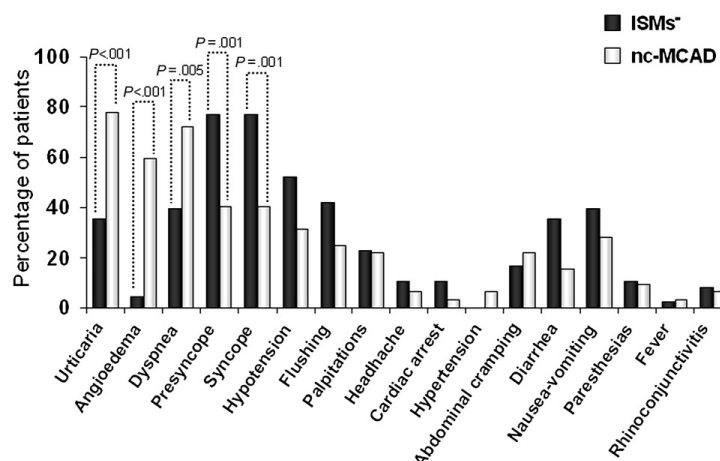


FIG 2. Overall distribution of clinical symptoms associated with the most severe MC mediators release episodes in ISMs⁺ (n = 48) vs nc-MCAD patients (n = 32).

and other clonal MCAD patients not fulfilling the criteria for SM (n = 3; 9%); in all 6 patients lacking specific IgE antibodies against *Hymenoptera* venom, the diagnosis of ISMs⁺ was confirmed. Besides acute episodes, associated allergic diseases were also diagnosed in 7 ISMs⁺ (1 contact dermatitis, 5 rhinoconjunctivitis, and 1 asthma) and in 5 nc-MCAD patients (2 rhinoconjunctivitis, 1 rhinitis, and 2 urticaria—1 because of grass pollen and 1 because of penicillin).

Predictive model for MC clonality (ISMs⁺ and other c-MCADs vs nc-MCAD) based on clinical and laboratory findings

Tables III and IV show the results of both the univariate and multivariate analyses of predictive factors for the identification of clonal patients (ISMs⁺ and c-MCAD; Table III) versus nc-MCAD (Table IV). Based on those variables with independent predictive value in the multivariate analysis, a scoring model was built to predict MC clonality (Fig 3) with a sensitivity and a specificity of 92% (95% CI, 85% to 100%) and 81% (95% CI, 68% to 95%), respectively, a positive predictive value of 89% (95% CI, 80% to 97%), and a negative predictive value of 87% (95% CI, 75% to 99%). Interestingly, when the same score was specifically applied to those 36 patients with *Hymenoptera* sting as the only trigger, the sensitivity increased up to 97% (95% CI, 90% to 100%) with a specificity of 71% (95% CI, 38% to 100%) versus 86% (95% CI, 72% to 100%) and 84% (95% CI, 70% to 98%) when applied to the remaining 47 patients, respectively.

DISCUSSION

Here we report on the largest cohort of patients presenting with severe MC mediator symptoms/anaphylaxis, in the absence of mastocytosis of the skin, in which detailed clinicobiological, morphologic, and molecular analyses were prospectively performed, aimed at discriminating between clonal and nonclonal

patients. Because all patients shared symptoms related with systemic MC mediators release, the term *systemic* MCAD might be more appropriate than just MCAD for clear distinction from other allergic and nonallergic diseases (eg, asthma, rhinitis, conjunctivitis, hypersensitivity diseases, or irritable bowel disease). Inclusion criteria required concordant immunophenotypic and molecular findings, and only a small proportion (<10%) of all consecutive patients analyzed had to be excluded because of lack of clonal molecular markers in the presence of immunophenotypically aberrant BM MCs.

In our series, based on the clonal nature of BM MCs, 2 different molecular subgroups of patients were defined: clonal and non-clonal patients. The vast majority of the clonal patients fulfilled the WHO diagnostic criteria for SM^{23,40,41} and thus, they were classified as ISMs⁺; the median follow-up for this group was of 22 months (range, 2-95 months); only 3 clonal patients did not fulfill the criteria for SM at the moment they entered the study. However, WHO diagnostic criteria for SM (3 minor criteria) were fulfilled in 1 of them 26 months after the referral because of a sustained increase of sBt >20 µg/L; the other 2 patients had a shorter follow-up of 8 and 11 months. Altogether, these results would support the notion that a strict follow-up should be made for years in patients with c-MCAD who initially do not fulfill the criteria for mastocytosis to rule out the diagnosis of SM. In line with data reported in patients with clonal MCs with *Hymenoptera* sting anaphylaxis in the absence of skin mastocytosis,²⁵ in our series, two thirds of these patients fulfilled the major criterion (compact clusters of >15 BM MCs), whereas in the remaining patients, either 3 or 4 minor criteria were fulfilled. Interestingly, ISMs⁺ showed a lower frequency of BM fibrosis together with a greater frequency of patients in which normal and aberrant MCs coexisted in the BM versus ISMs⁺ patients. It should be emphasized that ISMs⁺ clearly differs from the so-called isolated BM mastocytosis, an exceptional subcategory of SM in the absence of both skin lesions and MC mediator-related symptoms with a low MC burden^{40,41} whose diagnosis is

TABLE III. Univariate and multivariate analysis of clinical and laboratory variables associated with c-MCAD

Variable	c-MCAD/ISMs ⁺				
	Univariate analysis			Multivariate analysis	
	Patients (%)	RR (95% CI)	P value	HR (95% CI)	P value
Male	70.6	5.28 (2.02-13.78)	.001	4.77 (1.38-16.4)	.013
Absence of urticaria and angioedema*	62.7	9.09 (2.99-27.6)	<.001	5.39 (1.50-19.3)	.003
Dizziness and/or syncope*	94.1	9.60 (2.44-37.7)	.001	14.6 (1.94-109.8)	.009
Insect as trigger	66.7	4.4 (1.70-11.3)	.002		
Serum tryptase >25 µg/L†	47.1	6.22 (1.90-20.3)	.002	10.4 (1.99-54.7)	.006

Only those variables showing statistically significant differences in the univariate analysis for c-MCAD/ISMs are shown and were used in the multivariate analysis.

HR, Hazard ratio; RR, relative risk.

*During the most severe MC mediators release episode.

†Adjusted median of baseline serum tryptase at diagnosis in c-MCAD/ISMs⁺ group.

TABLE IV. Univariate and multivariate analysis of clinical and laboratory variables associated with nc-MCAD

Variable	nc-MCAD				
	Univariate analysis			Multivariate analysis	
	Patients (%)	RR (95% CI)	P value	HR (95% CI)	P value
Female	68.8	5.28 (2.02-13.7)	.001	3.81 (1.21-12.0)	.022
Urticaria or angioedema*	84.4	9.09 (2.99-27.6)	<.001	7.70 (2.19-26.9)	.001
Respiratory symptoms*	71.9	3.65 (1.41-9.45)	.008		
Drugs as trigger	34.4	4.81 (1.48-15.6)	.009		
Serum tryptase <15 µg/L†	46.9	4.74 (1.70-13.2)	.003	4.77 (1.35-16.8)	.015

Only those variables showing statistically significant differences in the univariate analysis for nc-MCAD are shown and were used in the multivariate analysis.

HR, Hazard ratio; RR, relative risk.

*During the most severe MC mediators release episode.

†Adjusted median of baseline serum tryptase at diagnosis in nc-MCAD group.

occasionally made during a BM study for pathological conditions other than mastocytosis.

Among patients with ISMs⁺, our results show an increased male predominance, as also described for ISMs⁺ patients with anaphylaxis.¹⁶ Furthermore, a higher frequency in males has been recently described among patients with ISM affected by IgE-mediated anaphylaxis versus adult patients without SM (2.3:1¹⁶ vs 1:1⁴²). Altogether, these results suggest the existence of a relationship between male sex and the severity of symptoms associated with the release of MC mediators in mastocytosis, especially among ISMs⁺. Of note, in this study, male predominance was particularly high among patients with ISMs⁺ with *Hymenoptera* sting as the only trigger, with its frequency rising up to 6.1:1.

In addition, our results show an association between the presence of anaphylaxis with cardiovascular symptoms in the absence of both urticaria and angioedema and ISMs⁺, in contrast with patients who did not show clonal MC in their bone marrow. These findings confirm and extend previous observations in smaller series of patients^{20,24} and indicate that mastocytosis should be suspected in patients with recurrent anaphylaxis lacking skin mastocytosis who present with syncopal or near-syncopal episodes^{22,43} without associated hives or angioedema.⁴⁴ Such differences between ISMs⁺ and nc-MCAD patients regarding MC mediator-related symptoms during acute episodes cannot be directly attributable to the lower MC numbers observed in nc-MCAD because no differences were found in this regard in nc-MCAD patients with or without cardiovascular symptoms or between nc-MCAD and clonal MCAD patients not fulfilling the criteria for SM; alternatively, differences in tissue distribution of MC from clonal versus nonclonal patients and/or the MC activation

and/or inhibition pathways involved in both patient groups could contribute to explaining their different clinical behavior.

The WHO recommends the use of increased sBt levels of >20 µg/L as a minor diagnostic criterion for SM.^{23,40,41} However, we found sBt levels >20 µg/L in around 20% to 25% of all patients of nc-MCAD, and Kassab et al¹⁵ reported 4 of 48 patients with recurrent unexplained MC activation symptoms without evidence for cutaneous or SM; in turn, 4% of all our ISMs⁺ and 6% of all clonal patients (including both ISMs⁺ and other c-MCAD) showed normal sBt levels (<11.5 µg/L). In fact, we show that a higher sensitivity and specificity to predict for clonality in patients without skin mastocytosis could be achieved once sBt values >25 µg/L or <15 µg/L were used in combination with other parameters; conversely, a mild increase in sBt (between 15 µg/L and 25 µg/L) alone had a limited predictive value for clonality in such patients. Furthermore, no clear relationship was found between sBt levels and the severity of clinical symptoms in ISMs⁺, c-MCAD, and nc-MCAD, supporting the notion that sBt by itself cannot be considered a predictor for the severity of symptoms.

As previously reported,^{16,25} our results also show that the most common trigger for anaphylactic episodes is *Hymenoptera* sting, especially among clonal patients. In contrast, drugs were mostly involved as a trigger in nc-MCAD. Interestingly, the relative distribution of triggers among patients with nc-MCAD (but not ISMs⁺ or other clonal patients) showed a similar pattern to that of patients with ISMs⁺ with anaphylactic episodes (data not shown). Nevertheless, because Instituto de Estudios de Mastocitosis de Castilla La Mancha: Clinical Reference Center of the Spanish Network on Mastocytosis is a reference center for

VARIABLE		SCORE
GENDER	Male	+1
	Female	-1
CLINICAL SYMPTOMS	Absence of urticaria and angioedema	+1
	Urticaria and/or angioedema	-2
	Presyncope and/or syncope	+3
TRYPTASE*	<15 ng/mL	-1
	>25 ng/mL	+2

*Baseline serum tryptase

SCORE < 2: low probability of clonal MCAD	
SCORE ≥ 2: high probability of clonal MCAD	
Sensitivity: 0.92 Positive Predictive Value: 0.89	Specificity: 0.81 Negative Predictive Value: 0.87

FIG 3. Scoring model proposed as a screening tool for the presence of clonal MCs in patients presenting with anaphylaxis in the absence of skin mastocytosis before a BM study.

Hymenoptera sting anaphylaxis, the prevalence of *Hymenoptera* sting as a trigger might be overestimated in our series. Furthermore, most cases triggered by *Hymenoptera* sting having specific IgE antibodies and all patients with a negative allergy study corresponded to ISMs⁻, indicating that in both circumstances, ISMs⁻ should be suspected. Despite the fact that ISMs⁻ patients that were only triggered by *Hymenoptera* venom shared several mastocytosis-associated events with other ISMs⁻ and ISMs⁺ patients (eg, the frequency of bone loss), the clinical behavior of the disease in between the acute episodes was characterized by a particularly lower frequency of symptoms (data not shown); the underlying mechanisms responsible for such a low baseline MC activation remain unknown.

Altogether, our findings suggest that diagnosis of ISMs⁻ and other c-MCAD patients is frequently made in an early phase of the disease with lower MC burden than observed in ISMs⁺. However, this could be also partially explained by the shorter time between the onset of symptoms and the BM study among both groups versus ISMs⁺ patients. In line with this hypothesis, periodical monitoring of sBt carried out in all patients as per the REMA protocol showed that in one third of patients with c-MCAD who initially met only the immunophenotypical and molecular WHO diagnostic criteria for SM, 3 minor criteria were fulfilled after 26 months because of a sustained increase of sBt >20 µg/L; in the other 2 patients, sBt remained below 20 µg/L 8 and 11 months after diagnosis. In addition, in 4 of 28 (14%) patients with ISMs⁺ with anaphylactic reactions, skin lesions appeared 12, 14, 19, and 32 months after the first MC mediators release episode, respectively. In contrast, at the time of closing this study, none of the 48 patients with ISMs⁻ had developed skin lesions after a median follow-up of 67 months (range, 8-380 months). The higher frequency of *KIT* mutation found among ISMs⁻ (and the 3 patients with c-MCAD who did not meet the criteria for SM) showing an aberrant BM MC phenotype in our series versus previous

reports^{19,20,25} could be a result of the investigation of *KIT* mutation in fluorescence-activated cell sorting-purified BM MCs (vs total mononuclear cells) in our study because of the greater sensitivity of the method.²⁰ We have recently described the association of ISM carrying *KIT* mutation in all myeloid and lymphoid BM cell lineages in addition to MCs, and a higher risk of disease progression, versus ISM with a more restricted involvement of hematopoietic cell lineages and *KIT* mutation limited to MCs.⁴⁵ In our patients with ISMs⁻ as well as the other 3 clonal patients, the *KIT* mutation was restricted to BM MCs in all but 3 ISMs⁻ patients (involving other myeloid cells and both myeloid and lymphoid cells in 2 patients and 1 patient, respectively), suggesting that long-term prognosis of ISMs⁻ could be even slightly better than that of ISMs⁺, at least in terms of disease progression. However, the morbidity rate of ISMs⁻ is not negligible because of (1) substantial impairment of the quality of life because of the recurrent nature of the episodes in many patients; (2) life-threatening complications occurring in a subset of patients, especially those with cardiovascular collapse or severe respiratory involvement; (3) a higher risk of MC mediators-related symptoms in patients undergoing medical procedures such as anesthesia or receiving contrast media; and (4), the relatively high risk of osteoporosis (even in young male patients) with the subsequent increased risk of bone fractures.

In summary, our results indicate that a significant percentage of clonal patients presenting with systemic MC activation symptoms in the absence of skin mastocytosis correspond to ISM at early phases of the disease typically characterized by (1) the absence of skin lesions, (2) a high prevalence in men, (3) anaphylaxis associated with cardiovascular symptoms in the absence of urticaria or angioedema frequently triggered by *Hymenoptera* sting, (4) fewer MC-related symptoms between the acute episodes associated with lower sBt than in ISMs⁺, (5) an increased incidence of osteoporosis, (6) a decreased frequency of BM fibrosis,

(7) a higher frequency of patients with coexisting normal and aberrant BM MCs, and (8) *KIT* mutation usually restricted to MCs. Further follow-up of patients fulfilling only 1⁴⁶ or 2 minor criteria for SM is warranted to determine whether they evolve to a true SM or whether represent a distinct disease subtype.⁴⁴ Similarly, periodical monitoring of the skin should be performed in all ISMs⁺ patients to check for the potential future development of typical mastocytosis skin lesions. Finally, close follow-up of those few patients carrying multilineal *KIT* mutations must be performed to detect early signs of disease progression.

Clinical implications: A significant percentage of c-MCADs represents a variant of ISM.

REFERENCES

- Galli SJ, Dvorak AM, Dvorak HF. Basophils and mast cells: morphologic insights into their biology, secretory patterns, and function. *Prog Allergy* 1984;34:1-141.
- Fukuoka Y, Xia HZ, Sanchez-Munoz LB, Dellinger AL, Escribano L, Schwartz LB. Generation of anaphylatoxins by human [beta]-tryptase from C3, C4, and C5. *J Immunol* 2008;180:6307-16.
- Núñez R, Escribano L, Scherthaner G, Prados A, Rodríguez-González R, Díaz-Agustín B, et al. Overexpression of complement receptors and related antigens on the surface of bone marrow mast cells in patients with systemic mastocytosis. *Br J Haematol* 2002;120:257-65.
- Katz HR, Raizman MB, Gartner CS, Scott HC, Benson AC, Austen KF. Secretory granule mediator release and generation of oxidative metabolites of arachidonic acid via Fc-γG receptor bridging in mouse mast cells. *J Immunol* 1991;148:868-71.
- Lobell RB, Arm JP, Raizman MB, Austen KF, Katz HR. Intracellular degradation of Fc gamma RIIB in mouse bone marrow culture-derived progenitor mast cells prevents its surface expression and associated function. *J Biol Chem* 1993;268:1207-12.
- Lobell RB, Austen KF, Katz HR. FcγgammaRIIB-mediated endocytosis and expression of cell surface FcγgammaRIIB1 and FcγgammaRIIB2 by mouse bone marrow culture-derived progenitor mast cells. *J Immunol* 1994;152:811-8.
- Woolhiser MR, Brockow K, Metcalfe DD. Activation of human mast cells by aggregated IgG through FcγgammaRI: additive effects of C3a. *Clin Immunol* 2004;110:172-80.
- Malaviya R, Gao ZM, Thankavel K, Van der Merwe PA, Abraham SN. The mast cell tumor necrosis factor α response to FimH-expressing *Escherichia coli* is mediated by the glycosylphosphatidylinositol-anchored molecule CD48. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:8110-5.
- Gommerman JL, Oh DY, Zhou XN, Tedder TF, Maurer M, Galli SJ, et al. A role for CD21/CD35 and CD19 in responses to acute septic peritonitis: a potential mechanism for mast cell activation. *J Immunol* 2000;165:6915-21.
- Supajatura V, Ushio H, Nakao A, Okumura K, Ra C, Ogawa H. Protective roles of mast cells against enterobacterial infection are mediated by Toll-like receptor 4. *J Immunol* 2001;167:2250-6.
- Varadarajalou S, Féger F, Thieblemont N, Ben Hamouda N, Pleau JM, Dy M, et al. Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 differentially activate human mast cells. *Eur J Immunol* 2003;33:899-906.
- Boyce JA. Mast cells: beyond IgE. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111:24-33.
- Roberts LJ. Carcinoid syndrome and disorders of systemic mast-cell activation including systemic mastocytosis. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1988;17:415-36.
- Metcalfe DD. Clinical advances in mastocytosis: an interdisciplinary roundtable discussion. *J Invest Dermatol* 1991;96(suppl):1S-6S.
- Kassab D, Koterba A, Jiang Y, Akin C. Elevated baseline tryptase levels in patients with mast cell activation syndromes without evidence of mastocytosis [abstract]. *J Allergy Clin Immunol* 2008;121:S67.
- González de Olano D, de la Hoz B, Nunez-Lopez R, Sanchez-Munoz L, Cuevas M, Dieguez C, et al. Prevalence of allergy and anaphylactic symptoms in 210 adult and pediatric patients with mastocytosis in Spain: a study of the Spanish network on mastocytosis (REMA). *Clin Exp Allergy* 2007;37:1547-55.
- Brockow K, Jofer C, Behrendt H, Ring J. Anaphylaxis in patients with mastocytosis: a study on history, clinical features and risk factors in 120 patients. *Allergy* 2008;63:226-32.
- Metcalfe DD. Classification and diagnosis of mastocytosis: current status. *J Invest Dermatol* 1991;96:2S-4S.
- Akin C, Metcalfe DD. Occult bone marrow mastocytosis presenting as recurrent anaphylaxis [abstract]. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111:S206.
- Akin C, Scott LM, Kocabas CN, Kushnir-Sukhov N, Brittain E, Noel P, et al. Demonstration of an aberrant mast cell population with clonal markers in a subset of patients with "idiopathic" anaphylaxis. *Blood* 2007;110:2331-3.
- Álvarez-Twose I, González de OD, Sánchez-Munoz L, Teodosio C, Jara-Acevedo M, Sánchez-Matas I, et al. Clinical, biological and molecular characteristics of mast cell activation disorders: a prospective study in 62 patients by the Spanish Network On Mastocytosis (REMA) [abstract]. *J Allergy Clin Immunol* 2009;123:S141.
- Sonneck K, Florian S, Mullauer L, Wimazal F, Fodinger M, Sperr WR, et al. Diagnostic and subdiagnostic accumulation of mast cells in the bone marrow of patients with anaphylaxis: monoclonal mast cell activation syndrome. *Int Arch Allergy Immunol* 2006;142:158-64.
- Valent P, Akin C, Escribano L, Fodinger M, Hartmann K, Brockow K, et al. Standards and standardization in mastocytosis: consensus statements on diagnostics, treatment recommendations and response criteria. *Eur J Clin Invest* 2007;37:435-53.
- Koterba AP, Akin C. Differences in the clinical presentation of anaphylaxis in patients with indolent systemic mastocytosis versus idiopathic anaphylaxis [abstract]. *J Allergy Clin Immunol* 2008;121:S68.
- Bonadonna P, Perbellini O, Passalacqua G, Caruso B, Colarossi S, Dal FD, et al. Clonal mast cell disorders in patients with systemic reactions to Hymenoptera stings and increased serum tryptase levels. *J Allergy Clin Immunol* 2009;123:680-6.
- Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis: report of a WHO Study Group. *World Health Organ Tech Rep Ser* 1994;843:1-129.
- Kanis JA. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis: synopsis of a WHO report. *WHO Study Group. Osteoporos Int* 1994;4:368-81.
- Miller PD. Guidelines for the diagnosis of osteoporosis: T-scores vs fractures. *Rev Endocr Metab Disord* 2006;7:75-89.
- Sperr W, Escribano L, Jordan JH, Scherthaner GH, Kundi M, Horny HP, et al. Morphologic properties of neoplastic mast cells: delineation of stages of maturation and implication for cytological grading of mastocytosis. *Leuk Res* 2001;25:529-36.
- Horny HP, Sillaber C, Menke D, Kaiserling E, Wehrmann M, Stehberger B, et al. Diagnostic value of immunostaining for tryptase in patients with mastocytosis. *Am J Surg Pathol* 1998;22:1132-40.
- Horny HP, Valent P. Diagnosis of mastocytosis: general histopathological aspects, morphological criteria, and immunohistochemical findings. *Leuk Res* 2001;25:543-51.
- Escribano L, Orfao A, Díaz-Agustín B, Villarrubia J, Cervero C, López A, et al. Indolent systemic mast cell disease in adults: immunophenotypic characterization of bone marrow mast cells and its diagnostic implications. *Blood* 1998;91:2731-6.
- Escribano L, Díaz-Agustín B, López A, López RN, García-Montero A, Almeida J, et al. Immunophenotypic analysis of mast cells in mastocytosis: when and how to do it: proposals of the Spanish Network on Mastocytosis (REMA). *Cytometry* 2004;58B:1-8.
- Sotlar K, Escribano L, Landt O, Möhrle S, Herrero S, Torrelo A, et al. One-step detection of c-kit point mutations using PNA-mediated PCR-clamping and hybridization probes. *Am J Pathol* 2003;162:737-46.
- García-Montero AC, Jara-Acevedo M, Teodosio C, Sánchez ML, Nunez R, Prados A, et al. KIT mutation in mast cells and other bone marrow haematopoietic cell lineages in systemic mast cell disorders: a prospective study of the Spanish Network on Mastocytosis (REMA) in a series of 113 patients. *Blood* 2006;108:2366-72.
- Wu Y, Basir Z, Kajdacsy-Balla A, Strawn E, Macias V, Montgomery K, et al. Resolution of clonal origins for endometriotic lesions using laser capture microdissection and the human androgen receptor (HUMARA) assay. *Fertil Steril* 2003;79(suppl 1):710-7.
- Butterfield JH, Weiler CR. Prevention of mast cell activation disorder-associated clinical sequelae of excessive prostaglandin D(2) production. *Int Arch Allergy Immunol* 2008;147:338-43.
- Sampson HA, Munoz-Furlong A, Bock SA, Schmitt C, Bass R, Chowdhury BA, et al. Symposium on the definition and management of anaphylaxis: summary report. *J Allergy Clin Immunol* 2005;115:584-91.
- Sampson HA, Munoz-Furlong A, Campbell RL, Adkinson NF Jr, Bock SA, Brannum A, et al. Second symposium on the definition and management of anaphylaxis: summary report—Second National Institute of Allergy and Infectious Disease/Food Allergy and Anaphylaxis Network Symposium. *J Allergy Clin Immunol* 2006;117:391-7.
- Valent P, Horny HP, Escribano L, Longley-BJ J, Li CL, Schwartz LB, et al. Diagnostic criteria and classification of mastocytosis: a consensus proposal. *Leuk Res* 2001;25:603-25.
- Horny HP, Metcalfe DD, Bennet JM, Bain BJ, Akin C, Escribano L, et al. Mastocytosis. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H,

- editors. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: IARC; 2008. p. 54-63.
42. Gaig P, Muñoz-Lejarazu D, Lleonart R, García Abujeta JL, Caballero T, Rodríguez A, et al. Prevalencia de alergia en la población adulta española. *Alergol Inmunol Clin* 2004;19:68-74.
43. Florian S, Krauth MT, Simonitsch-Klupp I, Sperr WR, Fritsche-Polanz R, Sonneck K, et al. Indolent systemic mastocytosis with elevated serum tryptase, absence of skin lesions, and recurrent severe anaphylactoid episodes. *Int Arch Allergy Immunol* 2005;136:273-80.
44. Greenhawt M, Akin C. Mastocytosis and allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2007;7:387-92.
45. Escribano L, Alvarez-Twose I, Sanchez-Munoz L, Garcia-Montero A, Nunez R, Almeida J, et al. Prognosis in adult indolent systemic mastocytosis: a long-term study of the Spanish Network on Mastocytosis in a series of 145 patients. *J Allergy Clin Immunol* 2009;124:514-21.
46. Hungness SI, Singer AM, Akin C. Food-dependent exercise-induced anaphylaxis associated with clonal mast cells carrying an activating c-Kit mutation [abstract]. *J Allergy Clin Immunol* 2007;119:S29.

A surprisingly high prevalence of D816V *KIT* mutation has been previously reported in normal subjects (2/9), atopic subjects (2/10), subjects with food anaphylaxis (5/11), subjects with anaphylaxis not triggered by foods (4/10); nevertheless, SM was not ruled out in any of these patients. Thus, caution should be taken in considering such results before their confirmation in independent series.^{E1} In this regard, we have performed *KIT* mutational analysis in purified BM MCs from 31 patients without mastocytosis

with myelodysplastic disorders (n = 17), acute myeloblastic leukemia (n = 10), and reactive cytopenias (n = 4), and none of them showed MC *KIT* mutation.

REFERENCE

- E1. Lawley W, Hird H, Mallinder P, McKenna S, Hargadon B, Murray A, et al. Detection of an activating c-kit mutation by real-time PCR in patients with anaphylaxis. *Mutat Res Fundam Mol Mech Mutagen* 2005;572:1-13.

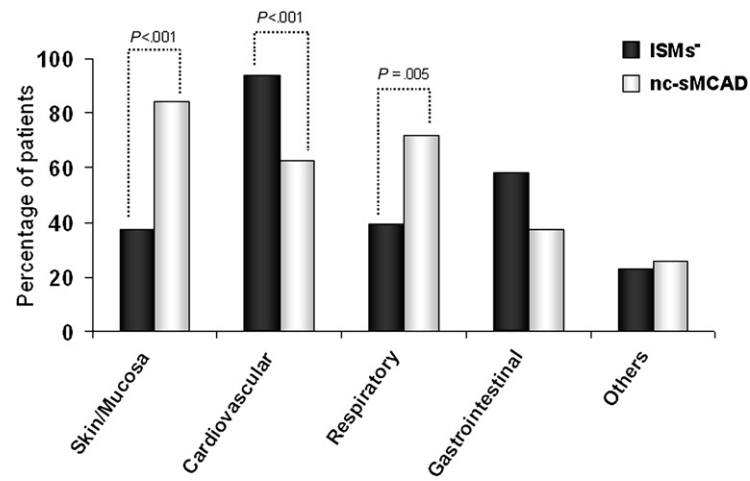


FIG E1. Distribution of clinical symptoms associated with the most severe MC mediators release episodes grouped by organ involvement in ISMs (n = 48) vs. nc-MCAD patients (n = 32).

3.2.2. VALIDATION OF THE REMA SCORE FOR PREDICTING MAST CELL CLONALITY AND SYSTEMIC MASTOCYTOSIS IN PATIENTS WITH SYSTEMIC MAST CELL ACTIVATION SYMPTOMS.

Iván Álvarez-Twose, David González-de-Olano, Laura Sánchez-Muñoz, Almudena Matito, María Jara-Acevedo, Cristina Teodósio, Andrés García-Montero, José Mário Morgado, Alberto Orfao y Luis Escribano.

Int Arch Allergy Immunol 2011;157(3):275-280.

Original Paper

International Archives of
**Allergy and
Immunology**

Int Arch Allergy Immunol 2012;157:275–280
DOI: 10.1159/000329856

Received: January 31, 2011
Accepted after revision: May 27, 2011
Published online: October 28, 2011

Validation of the REMA Score for Predicting Mast Cell Clonality and Systemic Mastocytosis in Patients with Systemic Mast Cell Activation Symptoms

I. Alvarez-Twose^{a, d} D. González-de-Olano^{b, d} L. Sánchez-Muñoz^{a, d} A. Matito^{a, d}
M. Jara-Acevedo^{c, d} C. Teodosio^{c, d} A. García-Montero^{c, d} J.M. Morgado^{a, d}
A. Orfao^{c, d} L. Escribano^{a, d}

^aInstituto de Estudios de Mastocitosis de Castilla La Mancha (CLMast), Hospital Virgen del Valle, Toledo,

^bServicio de Alergología, Hospital de Fuenlabrada, Madrid, ^cServicio General de Citometría, Centro de Investigación del Cáncer/IBMCC (USAL/CSIC) y Departamento de Medicina, Universidad de Salamanca, Salamanca, y ^dRed Española de Mastocitosis (REMA), España

Key Words

Mast cell · Mastocytosis · Mast cell activation syndrome · Tryptase · Clonality

Abstract

Background: A variable percentage of patients with systemic mast cell (MC) activation symptoms meet criteria for systemic mastocytosis (SM). We prospectively evaluated the clinical utility of the REMA score versus serum baseline tryptase (sBt) levels for predicting MC clonality and SM in 158 patients with systemic MC activation symptoms in the absence of mastocytosis in the skin (MIS). **Methods:** World Health Organization criteria for SM were applied in all cases. MC clonality was defined as the presence of *KIT*-mutated MC or by a clonal HUMARA test. The REMA score consisted of the assignment of positive or negative points as follows: male (+1), female (–1), sBt <15 µg/l (–1) or >25 µg/l (+2), presence (–2) or absence (+1) of pruritus, hives or angioedema and presence (+3) of presyncope or syncope. Efficiency of the REMA score for predicting MC clonality and SM was assessed by receiver operating characteristic (ROC) curve analyses and compared to those obtained by means of sBt levels alone. **Results:** Molecular studies revealed the presence of clonal MC in 68/80 SM cases and in 11/78 patients who did not meet the criteria for SM. ROC curve analyses

confirmed the greater sensitivity and a similar specificity of the REMA score versus sBt levels (84 vs. 59% and 74 vs. 70% for MC clonality and 87 vs. 62% and 73 vs. 71% for SM, respectively). **Conclusions:** Our results confirm the clinical utility of the REMA score to predict MC clonality and SM in patients suffering from systemic MC activation symptoms without MIS.

Copyright © 2011 S. Karger AG, Basel

Introduction

Mast cell (MC) activation disorders (MCAD) are a highly heterogeneous group of diseases characterized by the presence of episodic symptoms attributable to MC mediator release. Recently, a classification of diseases has been proposed associated with MC activation which comprises secondary, idiopathic and primary MC disorders [1]. The primary MC disorders include not only systemic mastocytosis (SM) with or without mastocytosis in the skin (MIS), but also disorders characterized by the presence of clonal MC not fulfilling criteria for SM, which have been the so-called monoclonal MC activation syndrome or clonal MCAD (c-MCAD) [1–3]. Efficient criteria to select for those MCAD patients without MIS with a high probability of having clonal bone marrow (BM)

KARGER

Fax +41 61 306 12 34
E-Mail karger@karger.ch
www.karger.com

© 2011 S. Karger AG, Basel
1018–2438/12/1573–0275\$38.00/0

Accessible online at:
www.karger.com/iaa

Correspondence to: Dr. Luis Escribano
Instituto de Estudios de Mastocitosis de Castilla La Mancha
Hospital Virgen del Valle
Carretera de Cobisa s/n, ES–45071 Toledo (Spain)
Tel. +34 92 526 9335, E-Mail lescribanom@sescam.jccm.es

Table 1. Clinical and serum criteria used by the REMA score (range: -4 to +7) recently proposed to predict BM MC clonality and SM in patients who present with systemic MC mediator release symptoms in the absence of MIS

Variable	Score
Gender	
Male	+1
Female	-1
Clinical symptoms	
Absence of urticaria, pruritus and angioedema	+1
Urticaria, pruritus and/or angioedema	-2
Presyncope and/or syncope	+3
Tryptase ¹	
<15 ng/ml	-1
>25 ng/ml	+2

Reprinted from Álvarez-Twose et al. [3] with permission from Elsevier. ¹ Baseline serum tryptase.

MC (usually associated with an underlying SM) for a complete BM study are warranted.

Currently, it is widely accepted that increased serum baseline tryptase (sBt) levels over 20 µg/l are highly suggestive of SM [2, 4]; nevertheless, recent data suggest that a lower threshold of 11.4 µg/l could be more efficient [5]. However, increased sBt levels are not specific of SM and can also be found in other allergic and nonallergic diseases [2, 6, 7]; in turn, normal sBt levels can also be detected in some patients with SM particularly at the early stages of the disease [3]. Recently, the Spanish Network on Mastocytosis (REMA) has built a simple clinical score associated with both a high sensitivity and specificity to predict BM MC clonality [3]. Here we prospectively evaluated the clinical utility of the REMA score versus sBt levels in predicting both MC clonality and the presence of an underlying SM, in an unselected group of 158 patients presenting with systemic and severe MC activation symptoms in the absence of MIS, independently of the *KIT* mutational status and immunophenotypic characteristics of BM MC.

Patients and Methods

Clinical and Allergic Workup

A total of 158 adult patients – 84 (53%) males and 74 (47%) females with a median age of 50 years (range: 17–81) – suffering from severe systemic MC activation-related symptoms in the absence of MIS, who were consecutively referred to the REMA (between February 2001 and October 2010) for screening of SM, were included in the study after informed consent was given by each subject. The clinical signs and symptoms occurring during acute

episodes and their specific triggers were recorded in each case. In patients who suffered from recurrent episodes, only those symptoms involving the most severe one were considered. Anaphylaxis was defined following previous published criteria [8]. Allergic workup included systematic measurement of sBt (CAP, Phadia Diagnostics, Uppsala, Sweden) and total serum IgE. Additional studies including specific IgE (Immuno CAP, Phadia Diagnostics) and skin tests were performed in those cases in which a specific trigger potentially causing an IgE-mediated reaction (e.g. insect sting, drugs or food) was identified.

BM Studies

In every case, a complete BM study was performed strictly following recently proposed criteria [2, 9, 10] including immunophenotypic analysis of BM MC [11, 12], detection of somatic activating exon 17 *KIT* mutations [13] and the pattern of inactivation of chromosome X in FACS-purified BM MC from 6 female patients lacking *KIT* mutations by the HUMARA assay [14].

Classification of Patients according to BM Findings

Following the currently accepted recommendations [2, 4, 10], patients were diagnosed with SM or clonal sMCAD (c-sMCAD) or nonclonal sMCAD (nc-sMCAD) depending on the presence versus absence of *KIT*-mutated MC or a clonal HUMARA test, respectively. In those cases in which molecular studies were either not performed or not valuable, *KIT* mutation was considered as unknown.

REMA Score

The REMA score [3] was used to classify the patients into two groups according to characteristics detailed in table 1. A cutoff value of ≥ 2 was considered to be associated with a high probability of c-sMCAD versus nc-sMCAD. The overall sensitivity and specificity of the REMA score was compared to those obtained by means of sBt levels alone with cutoff values for this latter parameter of 23.1 µg/l.

Statistical Analyses

For all continuous variables, median and range were calculated, while for categorical variables, frequencies were reported. The Mann-Whitney U and the χ^2 tests were used to assess the statistical significance of differences observed between groups for continuous and categorical variables, respectively. The optimal cutoff values of the REMA score and sBt levels for predicting SM and BM MC clonality were calculated by receiver operating characteristic (ROC) curves. Statistical comparisons between ROC curves were performed according to the nonparametric method described by DeLong et al. [15]. *p* values ≤ 0.05 were considered to be associated with statistical significance. All statistical analyses were performed with the SPSS 15.0 statistical software package (SPSS, Chicago, Ill., USA) and the Medcalc software (version 11.4; Medcalc, Mariakerke, Belgium).

Results

Patient Subgroups

Eighty out of 158 patients (51%) were diagnosed with SM. In this group, clonal BM MC were detected in 68/80 cases (85%) while in only 1 case *KIT* mutation was negative; in the remaining 11 patients, molecular studies were

Table 2. MC mediator release symptoms observed throughout the most severe episode in patients with systemic MC activation symptoms (n = 158) distributed according to the final diagnosis established after analysis of the BM

Clinical symptoms	No criteria for SM				SM cases (n = 80)	p value
	unknown <i>KIT</i> mutation (n = 15)	nc-sMCAD (n = 52)	c-sMCAD (n = 11)	non-SM cases (n = 78)		
Skin/mucosa						
Urticaria or pruritus	12 (80)	44 (84.6)	6 (54.5)	62 (79.5)	26 (32.5)	<0.001
Angioedema	7 (46.7)	30 (57.7)	3 (27.3)	40 (51.3)	7 (8.8)	<0.001
Cardiovascular						
Flushing	2 (13.3)	9 (17.3)	3 (27.3)	14 (17.9)	30 (37.5)	0.01
Palpitations	1 (6.7)	12 (23.1)	3 (27.3)	16 (20.5)	17 (21.3)	NS
Dizziness	5 (33.3)	24 (46.2)	4 (36.4)	33 (42.3)	64 (80)	<0.001
Syncope	5 (33.3)	14 (26.9)	6 (54.5)	25 (32.1)	58 (72.5)	<0.001
Hypotension	3 (20)	13 (25)	4 (36.4)	20 (25.6)	37 (46.3)	0.01
Hypertension	1 (6.7)	3 (5.8)	0	4 (5.1)	0	NS
Cardiac arrest	1 (6.7)	2 (3.8)	2 (18.2)	5 (6.4)	5 (6.3)	NS
Respiratory						
Dyspnea	9 (60)	25 (48.1)	7 (63.6)	41 (52.6)	33 (41.3)	NS
Gastrointestinal						
Abdominal cramping	3 (20)	9 (17.3)	2 (18.2)	14 (17.9)	11 (13.8)	NS
Diarrhea	3 (20)	6 (11.5)	0	9 (11.5)	22 (27.5)	0.007
Nausea or vomiting	5 (33.3)	14 (26.9)	3 (27.3)	22 (28.2)	31 (38.8)	NS
Other symptoms						
Headache	2 (13.3)	1 (1.9)	0	3 (3.8)	6 (7.5)	NS
Fever	0	1 (1.9)	0	1 (1.3)	2 (2.5)	NS
Rhinoconjunctivitis	1 (6.7)	4 (7.7)	0	5 (6.4)	7 (8.8)	NS
Paresthesias	1 (6.7)	6 (11.5)	2 (18.2)	9 (11.5)	11 (13.8)	NS

Results are expressed as total number of patients with percentages in parentheses.

p values refer to comparisons between SM cases versus non-SM cases. NS = Statistically not significantly different.

either not performed (n = 5) or not valuable (n = 6) but other WHO criteria for SM were fulfilled.

Among the 78 patients who did not meet criteria for SM, 11 cases (14%) showed *KIT*-mutated BM MC and they were thus classified as c-sMCAD; of note, in 4 of these 11 cases, simultaneous expression of CD25 by BM MC was also found. Fifty-two cases of these 78 patients (67%) showed no clonal/mutated BM MC and they were classified as nc-sMCAD. Finally, the other 15 non-SM patients (19%) were unclassifiable because *KIT* mutational analyses were not performed or they were not valuable due to the low number of BM MC. Among these latter 15 patients, none fulfilled the major criterion for SM and they all had <2 minor criteria (0 or 1).

Clinical Findings

The main clinical symptoms during acute episodes according to the different subgroups are shown in table 2. Most patients suffered from a combination of

symptoms, usually in a stepwise fashion, and they fulfilled criteria for anaphylaxis in 140/158 cases (89%). According to clinical data included in the REMA score, male gender, the presence of dizziness and/or syncope and the absence of hives, pruritus or angioedema were significantly ($p \leq 0.001$) more frequent in SM versus non-SM patients; by contrast, female gender as well as the presence of hives, pruritus or angioedema were significantly ($p \leq 0.001$) more frequent in non-SM cases versus SM patients. Table 3 shows the distribution of different triggers for MC mediator release episodes observed among the distinct subgroups of patients. Overall, the most common trigger was insect (mainly hymenoptera) sting. In 56 cases (35%), no identifiable trigger was found, while in 33 patients (21%) with ≥ 2 episodes, each episode was caused by a different trigger. Insects were also the most common trigger among SM patients (59 vs. 26% in non-SM cases; $p < 0.001$), whereas drug-induced MC mediator release was significantly more frequent

Table 3. Distribution of triggers for episodes of systemic MC-released mediator-associated symptoms in patients with systemic MC activation symptoms (n = 158) classified according to the final diagnosis established after analysis of the BM

Triggers	No criteria for SMS				SM (n = 80)	P value
	unknown <i>KIT</i> mutation (n = 15)	nc-sMCAD (n = 52)	c-sMCAD (n = 11)	non-SM cases (n = 78)		
Insects						
Hymenoptera	3 (20)	11 (21.2)	5 (45.5)	19 (24.4)	40 (50)	
Others/unknown	1 (6.7)	0	0	1 (1.3)	5 (6.3)	
Mixed	0	0	0	0	2 (2.5)	
Total of cases	4 (26.7)	11 (21.2)	5 (45.5)	20 (25.6)	47 (58.8)	<0.001
Drugs						
Antibiotics	2 (13.3)	7 (13.5)	3 (27.3)	12 (15.4)	6 (7.5)	
NSAIDs	2 (13.3)	3 (5.8)	0	5 (6.4)	5 (6.3)	
Other drugs	2 (13.3)	1 (1.9)	1 (9.1)	4 (5.1)	0	
Mixed	0	5 (9.6)	0	5 (6.4)	0	
Total of cases	6 (40)	16 (30.8)	4 (36.4)	26 (33.3)	11 (13.8)	0.004
Food						
Fruits	0	2 (3.8)	0	2 (2.6)	2 (2.5)	
Nuts	1 (6.7)	0	0	1 (1.3)	1 (1.3)	
Fish/seafood	1 (6.7)	7 (13.5)	1 (9.1)	9 (11.5)	7 (8.8)	
Other foods	1 (6.7)	0	1 (9.1)	2 (2.6)	1 (1.3)	
Mixed	0	1 (1.9)	0	1 (1.3)	1 (1.3)	
Total of cases	3 (20)	10 (19.2)	2 (18.2)	15 (19.2)	12 (15)	NS
Idiopathic	9 (60)	22 (42.3)	2 (18.2)	33 (42.3)	23 (28.8)	NS
Other triggers	0	1 (1.9)	1 (9.1)	2 (2.6)	3 (3.8)	NS

Results are expressed as total number of patients with percentages in parentheses.

p values refer to comparisons between SM cases versus non-SM cases. NS = Statistically not significantly different.

among non-SM cases versus SM patients (33 vs. 14%, respectively; $p = 0.004$).

Allergy Study

Median (range) sBt levels in SM, c-sMCAD and nc-sMCAD cases were 26.3 $\mu\text{g/l}$ (6.8–515), 18.6 $\mu\text{g/l}$ (8.4–40.3) and 20 $\mu\text{g/l}$ (3.5–151), respectively. sBt levels $>25 \mu\text{g/l}$ were detected in 51% of SM and 26% of non-SM patients ($p = 0.001$), while sBt levels $<15 \mu\text{g/l}$ were more frequent among non-SM cases versus SM patients (31 vs. 11%, respectively; $p = 0.003$). Conversely, no significant ($p > 0.05$) differences in median total serum IgE levels were observed between both groups of patients (64.9 kU/l, range: 1–1,247 vs. 38 kU/l, range: 2–1,194, respectively). Overall, an IgE-mediated mechanism was detected in 70/142 (49%) cases, mainly among cases that were exclusively triggered by insects (46/56; 82%); these IgE-mediated cases more frequently corresponded to SM than non-SM patients (61 vs. 39%; $p = 0.01$), but no differences were observed when cases only triggered by insects were

excluded from the analysis; interestingly, among these latter cases, all subjects who showed a negative allergy study ($n = 10$) fulfilled criteria for SM.

REMA Score

Figure 1 shows the REMA score values obtained for the different diagnostic subgroups. ROC curve analyses confirmed that a REMA score ≥ 2 was the most efficient cut-off value to predict both MC clonality and SM (fig. 2); at this cutoff value, an area under the curve of 0.846 ($p < 0.001$) and 0.857 ($p < 0.001$) was observed, respectively (sensitivity/specificity of 84/74% and 87/73%, respectively). These results reflected a significantly ($p < 0.001$) higher frequency of cases with a REMA score ≥ 2 among patients with clonal versus those with non-clonal BM MC (83%, $n = 66/79$ vs. 26%, $n = 14/53$, respectively) and also among patients with SM versus those who did not fulfill the WHO criteria for SM (87%, $n = 70/80$ vs. 27%, $n = 21/78$, respectively). Once compared to the optimal sBt cutoff value obtained in our series (23.1 $\mu\text{g/l}$), a higher ef-

Fig. 1. Distribution of SM versus non-SM patients presenting with systemic MC mediator release symptoms according to the REMA score. ISM = Indolent SM.

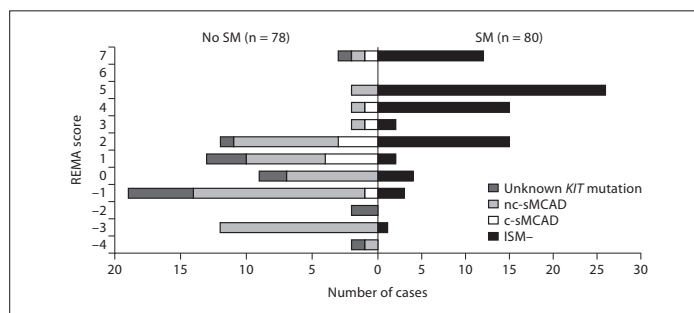
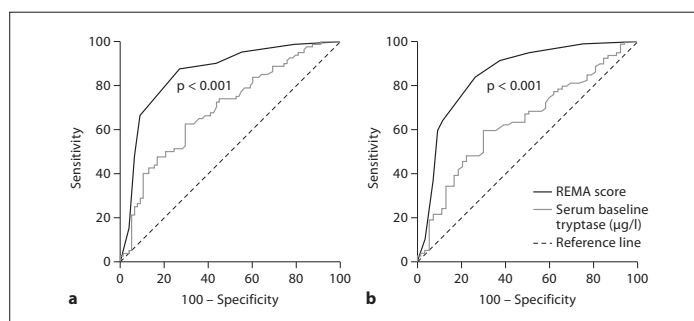


Fig. 2. ROC curve analyses of the efficiency (sensitivity, specificity and area under the curve) of the REMA score versus sBt levels alone to predict BM MC clonality (a) and SM (b) in patients presenting with systemic MC mediator release symptoms in the absence of MIS.



efficiency of the REMA score was observed, the former criteria showing a significantly ($p < 0.001$) lower area under the curve, sensitivity and specificity at this sBt cutoff level to predict both MC clonality (0.633, 59 and 70%, respectively) and the presence of SM (0.693, 62 and 71%, respectively) versus the REMA score (see text above and fig. 2).

Discussion

Given the clinical heterogeneity of patients presenting with systemic MC activation-related symptoms, their recognition and appropriate classification remain a challenge for physicians in daily clinical practice. In the present study, we have further investigated the clinical utility of the REMA score [3] in a larger prospective series of unselected patients to predict not only MC clonality but also the diagnosis of SM according to WHO criteria prior to a BM study. Overall, our results confirm that a REMA score ≥ 2 is associated with the highest sensitivity and specificity to predict both MC clonality and SM, the efficiency of this score-based approach being significantly higher than the

optimal sBt cutoff values (23.1 $\mu\text{g/l}$) obtained for the same purposes in the same group of patients. Accordingly, a REMA score ≥ 2 was able to predict MC clonality in most clonal cases and to correctly classify $>85\%$ of SM patients.

Interestingly, in our study, we have identified a group of patients who, despite having a clonal BM MC population (even in the context of an aberrant expression of CD25+ by BM MC in some of these cases) did not fulfill the WHO criteria for SM. Following recently proposed criteria, these patients were classified from a molecular point of view as c-sMCAD for a clear distinction from both SM cases and nc-sMCAD patients. At present, it is well known that somatic *KIT* mutations involving codon 816 are associated with constitutive downstream activation of MC, independent of stem cell factor binding; therefore, these *KIT* mutations in c-sMCAD cases may facilitate by themselves the development of MC activation symptoms although not enough criteria for SM are fulfilled. Whether these c-sMCAD cases actually correspond to early stages of true SM or whether they represent a new clonal MC-related entity remains to be determined and deserves further investigations.

In summary, in the present study, we confirm the clinical utility of the REMA score to be used prospectively to predict not only MC clonality, but also the presence of an underlying SM in patients presenting with systemic MC activation symptoms, including anaphylaxis. Although the REMA score cannot replace the application of the WHO-accepted criteria to diagnose or absolutely rule out SM, we strongly recommend considering this simple method to be applied by general practitioners and medical specialists as part of the workup of all patients presenting with systemic MC mediator release episodes in the absence of skin lesions for the screening of clonal MC disorders including c-sMCAD and SM. This would avoid unnecessary BM studies and, at the same time, it will improve the identification of SM cases lacking MIS who have low sBt levels. Given the typically low BM MC burden detected in most cases, it is recommended that BM studies are carried out in Reference Centers for MC-relat-

ed diseases, in which highly sensitive techniques are routinely applied to the study of the BM MC immunophenotype and molecular features (e.g. *KIT* mutation) at minimal disease states, to avoid false-negative results.

Acknowledgements

This work was supported by grants from Ministerio de Sanidad y Asuntos Sociales (FIS/FEDER PS09/00032); Junta de Comunidades de Castilla La Mancha (FISCAM 2007/36, FISCAM 2008/46); Ministerio de Ciencia e Innovación of Spain (PS09/00032 and RETICS RD06/0020/0035-FEDER); Junta de Castilla y León (Grant SAN1778/2009 and GR37) and Fundación Española de Mastocitosis (FEM 2010). A.G.-M. is supported by a grant from FIS/FEDER (CP03/00035); C.T. was supported by a grant from the Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) of Portugal (SFRH/BD/17545/2004) and by a grant from the Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS) of the Ministerio de Ciencia e Innovación of Spain (PI08/90881).

References

- Akin C, Valent P, Metcalfe DD: Mast cell activation syndrome: proposed diagnostic criteria. *J Allergy Clin Immunol* 2010;126:1099–1104.
- Valent P, Akin C, Escribano L, Fodinger M, Hartmann K, Brockow K, Castells M, Sperr WR, Kluin-Nelemans HC, Hamdy NA, Lortholary O, Robyn J, van Doormaal J, Sotlar K, Hauswirth AW, Arock M, Hermine O, Hellmann A, Triggiani M, Niedoszytko M, Schwartz LB, Orfao A, Horny HP, Metcalfe DD: Standards and standardization in mastocytosis: consensus statements on diagnosis, treatment recommendations and response criteria. *Eur J Clin Invest* 2007;37:435–453.
- Alvarez-Twose I, Gonzalez de Olano D, Sanchez-Munoz L, Matito A, Esteban-Lopez MI, Vega A, Mateo MB, Alonso Diaz de Durana MD, de la Hoz B, Del Pozo MD, Caballero T, Rosado A, Sanchez-Matas I, Teodosio C, Jara-Acevedo M, Mollejo M, Garcia-Montero A, Orfao A, Escribano L: Clinical, biological and molecular characteristics of systemic mast cell disorders presenting with severe mediator-related symptoms. *J Allergy Clin Immunol* 2010;125:1269–1278.
- Horny HP, Metcalfe DD, Bennet JM, Bain BJ, Akin C, Escribano L, Valent P: Mastocytosis; in Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW (eds): *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. Lyon, IARC, 2008, pp 54–63.
- Metcalfe DD, Schwartz LB: Assessing anaphylactic risk? Consider mast cell clonality. *J Allergy Clin Immunol* 2009;123:687–688.
- Ferrer M, Nunez-Cordoba JM, Luquin E, Grattan CE, De la Borbolla JM, Sanz ML, Schwartz LB: Serum total tryptase levels are increased in patients with active chronic urticaria. *Clin Exp Allergy* 2010;40:1760–1766.
- Sperr WR, El-Samahi A, Kundi M, Girschikofsky M, Winkler S, Lutz D, Endler G, Rumpold H, Agis H, Sillaber C, Jager U, Valent P: Elevated tryptase levels selectively cluster in myeloid neoplasms: a novel diagnostic approach and screen marker in clinical haematology. *Eur J Clin Invest* 2009;39:914–923.
- Sampson HA, Munoz-Furlong A, Campbell RL, Adkinson NF Jr, Bock SA, Branum A, Brown SG, Camargo CA Jr, Cydulka R, Galli SJ, Gidudu J, Gruchalla RS, Harlor AD Jr, Hepner DL, Lewis LM, Lieberman PL, Metcalfe DD, O'Connor R, Muraro A, Rudman A, Schmitt C, Scherrer D, Simons FE, Thomas S, Wood JP, Decker WW: Second symposium on the definition and management of anaphylaxis: summary report – Second National Institute of Allergy and Infectious Disease/Food Allergy and Anaphylaxis Network symposium. *J Allergy Clin Immunol* 2006;117:391–397.
- Escribano L, Alvarez-Twose I, Sanchez-Munoz L, Garcia-Montero A, Nunez R, Almeida J, Jara-Acevedo M, Teodosio C, Garcia-Cosio M, Bellas C, Orfao A: Prognosis in adult indolent systemic mastocytosis: a long-term study of the Spanish Network on Mastocytosis in a series of 145 patients. *J Allergy Clin Immunol* 2009;124:514–521.
- Sanchez-Munoz L, Alvarez-Twose I, Garcia-Montero AC, Teodosio C, Jara-Acevedo M, Pedreira CE, Matito A, Morgado JM, Sanchez ML, Mollejo M, Gonzalez-de-Olano D, Orfao A, Escribano L: Evaluation of the WHO criteria for the classification of patients with mastocytosis. *Mod Pathol* 2011;24:1157–1168.
- Escribano L, Diaz-Agustin B, Lopez A, Lopez RN, Garcia-Montero A, Almeida J, Prados A, Angulo M, Herrero S, Orfao A, Spanish NM: Immunophenotypic analysis of mast cells in mastocytosis: when and how to do it. Proposals of the Spanish network on mastocytosis (REMA). *Cytometry B Clin Cytom* 2004;58B:1–8.
- Sanchez-Munoz L, Teodosio C, Morgado JM, Escribano L: Immunophenotypic characterization of bone marrow mast cells in mastocytosis and other mast cell disorders. *Methods Cell Biol* 2011;103:333–359.
- Garcia-Montero AC, Jara-Acevedo M, Teodosio C, Sanchez ML, Nunez R, Prados A, Aldanondo I, Sanchez L, Dominguez M, Botana LM, Sanchez-Jimenez F, Sotlar K, Almeida J, Escribano L, Orfao A: *KIT* mutation in mast cells and other bone marrow haematopoietic cell lineages in systemic mast cell disorders. A prospective study of the Spanish Network on Mastocytosis (REMA) in a series of 113 patients. *Blood* 2006;108:2366–2372.
- Wu Y, Basir Z, Kajdacsy-Balla A, Strawn E, Macias V, Montgomery K, Guo SW: Resolution of clonal origins for endometriotic lesions using laser capture microdissection and the human androgen receptor (HUMARA) assay. *Fertil Steril* 2003;79(Suppl 1):710–717.
- DeLong ER, DeLong DM, Clarke-Pearson DL: Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: a nonparametric approach. *Biometrics* 1988;44:837–845.

3.2.3. NONAGGRESSIVE SYSTEMIC MASTOCYTOSIS (SM) WITHOUT SKIN LESIONS ASSOCIATED WITH INSECT-INDUCED ANAPHYLAXIS SHOWS UNIQUE FEATURES VERSUS OTHER INDOLENT SM.

Iván Álvarez-Twose, Roberta Zanotti, David González-de-Olano, Patrizia Bonadonna, Arancha Vega, Almudena Matito, Laura Sánchez-Muñoz, José Mário Morgado, Omar Perbellini, Andrés García-Montero, Giovanna De Matteis, Cristina Teodósio, Maurizio Rossini, María Jara-Acevedo, Donatella Schena, Andrea Mayado, Alberto Zamò, Manuela Mollejo, Paula Sánchez-López, Nieves Cabañes, Alberto Orfão y Luis Escribano.

J Allergy Clin Immunol 2013;133(2):520-528.

Nonaggressive systemic mastocytosis (SM) without skin lesions associated with insect-induced anaphylaxis shows unique features versus other indolent SM

Iván Álvarez-Twose, MD,^{a,b} Roberta Zanotti, MD,^{c,d} David González-de-Olano, MD,^{b,e} Patrizia Bonadonna, MD,^{d,f} Arantza Vega, MD,^g Almudena Matito, MD,^{a,b} Laura Sánchez-Muñoz, MD, PhD,^{a,b} José Mário Morgado, MSc,^{a,b} Omar Perbellini, MD,^{c,d} Andrés García-Montero, PhD,^{b,h} Giovanna De Matteis, MD,^{d,i} Cristina Teodósio, MSc,^{b,h} Maurizio Rossini, MD,^{d,i} María Jara-Acevedo, MSc,^{b,h} Donatella Schena, MD,^{d,k} Andrea Mayado, PhD,^{b,h} Alberto Zamò, MD,^{d,i} Manuela Mollejo, MD, PhD,^{b,m} Paula Sánchez-López, MD,ⁿ Nieves Cabañes, MD,ⁿ Alberto Orfao, MD, PhD,^{b,h,*} and Luis Escribano, MD, PhD,^{b,*} on behalf of the Spanish Network on Mastocytosis (REMA) and the Italian Network on Mastocytosis (RIMA) Toledo, Madrid, Guadalajara, and Salamanca, Spain, and Verona, Italy

Background: Indolent systemic mastocytosis (ISM) without skin lesions (ISM⁻) shows a higher prevalence in males, lower serum baseline tryptase levels, and *KIT* mutation more frequently restricted to bone marrow (BM) mast cells (MCs) than ISM with skin lesions (ISM⁺). Interestingly, in almost

one-half of ISM⁻ patients, MC-mediator release episodes are triggered exclusively by insects.

Objective: We aimed to determine the clinical and laboratory features of ISM⁻ associated with insect-induced anaphylaxis (insectISM⁻) versus other patients with ISM.

Methods: A total of 335 patients presenting with MC activation syndrome, including 143 insectISM⁻, 72 ISM⁻ triggered by other factors (otherISM⁻), 56 ISM⁺, and 64 nonclonal MC activation syndrome, were studied.

Results: Compared with otherISM⁻ and ISM⁺ patients, insectISM⁻ cases showed marked male predominance (78% vs 53% and 46%; $P < .001$), a distinct pattern of MC-related symptoms, and significantly lower median serum baseline tryptase levels (22.4 vs 28.7 and 45.8 $\mu\text{g/L}$; $P \leq .009$). Moreover, insectISM⁻ less frequently presented BM MC aggregates (46% vs 70% and 81%; $P \leq .001$), and they systematically showed MC-restricted *KIT* mutation.

Conclusions: ISM⁻ patients with anaphylaxis triggered exclusively by insects display clinical and laboratory features that are significantly different from other ISM cases, including other ISM⁻ and ISM⁺ patients, suggesting that they represent a unique subgroup of ISM with a particularly low BM MC burden in the absence of adverse prognostic factors. (J Allergy Clin Immunol 2014;133:520-8.)

Key words: Mast cell, mastocytosis, anaphylaxis, insect, Hymenoptera, insect sting anaphylaxis

From ^aInstituto de Estudios de Mastocitosis de Castilla La Mancha (CLMast), Hospital Virgen del Valle, Toledo; ^bthe Spanish Network on Mastocytosis (REMA), Toledo and Salamanca; ^cthe Section of Haematology, Department of Medicine, University of Verona, Verona; ^dthe Multidisciplinary Outpatients Clinics for Mastocytosis, Verona; ^ethe Allergy Unit, Hospital de Fuenlabrada, Madrid; ^fthe Allergy Unit, Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata, Verona; ^gthe Allergy Department, Hospital de Guadalajara, Guadalajara; ^hCentro de Investigación del Cáncer/IBMCC (USAL/CSIC) and IBSAL, Departamento de Medicina and Servicio General de Citometría, University of Salamanca, Salamanca; ⁱthe Clinical Chemistry and Haematology, Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata, Verona; ^jthe Section of Rheumatology, Department of Medicine, Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata, Verona; ^kthe Section of Dermatology, Department of Medicine, Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata, Verona; ^lthe Department of Pathology, Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata, Verona; ^mthe Pathology Department, Hospital Virgen de la Salud, Toledo; and ⁿthe Allergy Unit, Hospital Virgen del Valle, Toledo.

*These authors contributed equally to this work.

Supported by Fondo de Investigaciones Sanitarias –FIS– of the Instituto de Salud Carlos III, Ministry of Economy and Competitiveness, Madrid, Spain grant PS09/00032; Fundación Sociosanitaria de Castilla-La Mancha grants 2010/008 and G-2010/C-002; Fundación Española de Mastocitosis grant FEM 2011; BioB-HVS is supported by grant RETICS (Redes Temáticas de Investigación Cooperativa en Salud) RD09/00760074 (Toledo, Spain); RTICC (Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer) grants RD09/0076/00133, RD12/0036/0048; FIS; FEDER, Ministry of Economy and Competitiveness, Madrid, Spain grant PI11/02399; and Fundación Ramón Areces, Madrid, Spain grant CIVP16A1806; and by Associazione Italiana Leucemie e Linfomi di Verona (AIL-Verona) and ASIMAS (Associazione Italiana Mastocitosis).

Disclosure of potential conflict of interest: L. Escribano has been supported by one or more grants from Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Economía y Competitividad, Fundación Sociosanitaria de Castilla La Mancha, and from FEM. A. García-Montero has been supported by one or more grants from ISCIII, M. Mollejo and A. Orfao have been supported by one or more grants from Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Economía y Competitividad. L. Sánchez-Muñoz has been supported by one or more grants from Fundación Sociosanitaria de Castilla La Mancha. A. Vega has consultancy arrangements with ALK-Abelló and has received one or more payments for lecturing from or is on the speakers' bureau for MEDA, Allergy Therapeutics, Leti, and Almirall. R. Zanotti has been supported by one or more grants from AIL ASIMAS. The rest of the authors declare that they have no relevant conflicts of interest.

Received for publication March 19, 2013; revised June 6, 2013; accepted for publication June 17, 2013.

Available online August 6, 2013.

Corresponding author: Iván Álvarez-Twose, MD, Instituto de Estudios de Mastocitosis de Castilla La Mancha (CLMast), Hospital Virgen del Valle, Carretera de Cobisa s/n, 45071 Toledo, Spain. E-mail: ivana@sescam.jccm.es.
0091-6749/\$36.00

© 2013 American Academy of Allergy, Asthma & Immunology
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2013.06.020>

Abbreviations used

BM: Bone marrow
 CLMast: Instituto de Estudios de Mastocitosis de Castilla La Mancha, The Clinical Reference Centre of the Spanish Network on Mastocytosis (REMA)
 ISM: Indolent systemic mastocytosis
 ISMs⁺: Indolent systemic mastocytosis with skin lesions
 ISMs⁻: Indolent systemic mastocytosis without skin lesions
 MC: Mast cell
 MCAS: Mast cell activation syndrome
 REMA: Spanish Network on Mastocytosis
 sBT: Serum baseline tryptase
 SM: Systemic mastocytosis
 VIT: Venom immunotherapy
 WHO: World Health Organization

ISMs⁻, especially when IgE-mediated mechanisms are involved. Recently, the Spanish Network on Mastocytosis (REMA) proposed a relatively simple clinical score that proved to be of great value for predicting ISMs⁻ in patients with systemic MC activation symptoms^{14,15}; such score is currently recommended by the REMA in the routine clinical workup of patients presenting with MC activation syndromes (MCASs) suspicious of an underlying clonal MC disorder, in the absence of skin lesions. Furthermore, we have shown that ISMs⁻ patients display clinical, biological, and molecular characteristics that differ significantly from classical ISM presenting with skin lesions (ISMs⁺).¹⁴ Among other features, ISMs⁻ patients show a clearly higher male predominance, lower serum baseline tryptase (sBT) levels, less MC-related symptoms in between acute episodes, and *KIT* mutation typically restricted to MCs. Interestingly, in the latter REMA study,¹⁴ insects (mainly hymenoptera sting) were the most common trigger for acute MC-mediator release episodes in ISMs⁻ patients, with a frequency of up to around one-half of the cases. Because the Instituto de Estudios de Mastocitosis de Castilla La Mancha (CLMast) is a National Reference Centre for Hymenoptera sting anaphylaxis, the overall frequency of SM among patients with insect-induced anaphylaxis could have been overestimated. However, the high frequency of ISMs⁻ in such patients contrasts with that found both in cases presenting with MC activation symptoms triggered by other factors (eg, drugs and foods) and in patients with unidentified triggers. Of note, prospective evaluation of the REMA score has shown a greater sensitivity in patients with anaphylaxis triggered exclusively by insects than in cases associated with other triggers.¹⁴ Altogether, these observations suggest that ISMs⁻ associated with insect-induced anaphylaxis might display unique features that could contribute to explain, at least in part, the previously reported differences between ISMs⁻ and ISMs⁺ cases.

Here, we compared the demographic, clinical, histopathologic, biological, and molecular characteristics of ISMs⁻ patients who experienced anaphylaxis triggered exclusively by insects (n = 143), with other ISMs⁻ cases (n = 72), as well as ISMs⁺ patients who presented with anaphylaxis (n = 56).

METHODS**Clinical and allergic workup**

A total of 335 adult patients (195 men and 140 women; median age, 50 years; range, 18–81 years) with acute systemic MC-mediator release

episodes were studied. From these patients, 271 cases (175 men and 96 women; median age, 48 years; range 18–78 years) were diagnosed with ISM according to the World Health Organization (WHO) criteria.¹⁶ All consecutive patients who gave their informed consent to participate were enrolled in the study from August 1999 to December 2012, at 2 European Reference Centres for mastocytosis: CLMast, Toledo (Spain), and Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata, Verona (Italy). Here, we analyzed the data collected prospectively for these patients, from whom 158 have been included in previous reports.^{14,15} In every case, careful skin examination was performed, and baseline MC-related symptoms as well as clinical characteristics of acute MC-mediator release episodes were recorded. For those patients who experienced recurrent MC-mediator release episodes, only the clinical profile of the most severe episode was considered for this study.

Allergic workup systematically included measurement of sBT by ImmunoCAP (Phadia Diagnostics, ThermoFisher Scientific, Uppsala, Sweden) and total serum IgE levels. In addition, a potentially underlying IgE-mediated mechanism for anaphylactic episodes was investigated in suspected subjects through the measurement of specific serum IgE antibodies by ImmunoCAP (ThermoFisher Scientific and CAP-FEIA system Unicap 100; Phadia, Uppsala, Sweden), whenever a specific assay was commercially available; in addition, cutaneous tests (skin prick and intradermal tests) were also performed in patients in whom specific triggers (eg, insect sting, food, or specific drugs such as penicillin) were identified, according to well-established recommendations.¹⁷ In all ISMs⁻ patients who were able to identify wasps or bees as triggers for anaphylaxis and showed both negative specific IgE and cutaneous tests against *Apis mellifera*, *Vespa* species, and *Polistes dominulus* (n = 14), the presence and levels of serum specific IgE antibodies directed against individual components from bee and wasp venoms were assessed. More precisely, specific IgE to 6 natural (n) major allergens (nApi m1, nApi m2, nPol d1, nPol d2, nVes v1, and nVes v5) obtained as described elsewhere¹⁸ were determined with the ADVIA Centaur system (Siemens Medical Solutions Diagnostics, Tarrytown, NY) in 11 patients with a negative allergy study referred to the CLMast; similar determinations (component-based analyses) were performed in 3 Italian patients with a negative allergy study by the ImmunoCAP system (CAP-FEIA system Unicap 100; Phadia) with the use of 3 recombinant (r) allergens (rApi m1, rPol d5, and rVes v5). Specific IgE levels < 0.35 KU/L measured by either the ImmunoCAP or ADVIA systems were considered as negative.

REMA score and BM studies

The REMA score (see Table E1 in this article's Online Repository at www.jacionline.org) was prospectively applied to 279 patients (215 ISMs⁻ and 64 nonclonal MCAS) who underwent a complete BM study because of systemic MC-mediator release symptoms in the absence of skin lesions. The overall score for individual patients ranged from -4 to 7 and a score of ≥2 was considered to be highly predictive for SM, as previously recommended.^{14,15} The sensitivity and the specificity of the REMA score were separately analyzed in cases in whom insect sting was the only trigger identified (n = 159) and in the remaining group of patients (n = 128).

In all cases included in this study, a complete BM study was performed according to previously defined recommendations^{8,16,19} for cytomorphology,^{13,20} immunohistochemistry,^{13,21–23} flow cytometry,^{24–26} and *KIT* mutational analysis.^{6,27,28} In cases studied at the CLMast (n = 271), detection of *KIT* mutations was further performed in genomic DNA from populations purified by fluorescence-activated cell sorting; these populations were BM MCs, neutrophils, eosinophils, monocytes, lymphocytes, CD34⁺ hematopoietic progenitor and precursor cells, and nucleated red cells, as described elsewhere.⁶ Diagnosis of SM was made according to the current WHO criteria.¹⁶

Statistical methods

For all continuous variables, median values and range were calculated, whereas for categorical variables, frequencies were reported. Comparisons between groups were performed with the Mann-Whitney *U* and the χ^2 tests for continuous (nonparametric) and categorical variables, respectively.

P values $\leq .05$ were considered to be associated with statistical significance. All statistical analyses were performed with the SPSS 20.0 statistical software package (SPSS, Chicago, Ill).

RESULTS

Prediction of SM by the REMA score according to the trigger for anaphylaxis

Overall, the REMA score^{14,15} showed both a high sensitivity (91%; 95% CI, 87%-95%) and specificity (75%; 95% CI, 64%-86%), for the identification of SM in the whole group of 279 patients who underwent a BM study because of MC activation symptoms in the absence of skin lesions (Table I). When only those cases presenting systemic MC activation symptoms exclusively triggered by insects ($n = 155$) were considered separately from the other cases ($n = 124$), slight differences were noted between both groups. Such differences consisted of a better sensitivity (92%; 95% CI, 88%-97%) but a lower specificity (67%; 95% CI, 40%-93%) for the insect-only triggered cases than for the other patients with sensitivity of 88% (95% CI, 80%-95%) and specificity of 77% (95% CI, 65%-88%) (Table I).

Triggers for MC-mediator release episodes and ISM patient groups

Overall, insect sting/bite (mainly Hymenoptera sting) was identified as the only trigger for acute MC-mediator release episodes in 143 of 215 ISMs⁻ cases (66%); in the remaining 72 ISMs⁻ patients (34%), other triggers including food ($n = 14$), drugs ($n = 10$), unknown ($n = 9$), stress ($n = 2$), and different combinations of the former triggers ($n = 37$) were recognized (see Fig E1, A and B, in this article's Online Repository at www.jacionline.org). By contrast, MC activation episodes in ISMs⁺ patients ($n = 56$) were mainly triggered by unidentified factors ($n = 21$; 38%), followed by different combinations of triggers ($n = 12$; 21%) and drugs ($n = 11$; 20%), insects being involved as the only trigger for anaphylaxis in only 7 cases (13%) ($P < .001$ vs ISMs⁻) (see Fig E1, C). On the basis of the specific triggers for MC activation episodes identified and the absence versus presence of skin lesions, 3 groups of patients were defined: ISMs⁻ triggered exclusively by insects (insectISMs⁻; $n = 143$), ISMs⁻ triggered by factors other than insects only (otherISMs⁻; $n = 72$), and ISMs⁺ ($n = 56$).

Clinical features of ISMs⁻ cases with insect-induced anaphylaxis compared with other ISM patients

All ISM cases included in the study fulfilled well-defined criteria for anaphylaxis.²⁹ Overall, a significant predominance in men (78% vs 53% and 46%; $P < .001$) together with a lower frequency of recurrent anaphylaxis (45% vs 82% and 71%; $P \leq .001$) were observed among insectISMs⁻ patients compared with both otherISMs⁻ and ISMs⁺, respectively (Table II).

For acute symptoms, significant differences were found among insectISMs⁻ cases versus both otherISMs⁻ and ISMs⁺ cases (Fig 1, A). These included a lower frequency of urticaria (14% vs 32% and 29%; $P = .002$ and $P = .01$, respectively), flushing (12% vs 61% and 43%; $P < .001$), abdominal cramping (4% vs 18% and 32%; $P = .01$ and $P < .001$, respectively), diarrhea (12% vs 31% and 32%; $P = .007$ and $P = .006$, respectively),

TABLE I. Sensitivity and specificity of the REMA score among 279 patients with MCAS in the absence of skin lesions who underwent BM study

	Sensitivity (95% CI)	Specificity (95% CI)
Patients with MCAS exclusively triggered by insects ($n = 155$), %	92 (88-97)	67 (40-93)
Other patients with MCAS ($n = 124$), %	88 (80-95)	77 (65-88)
All patients with MCAS ($n = 279$), %	91 (87-95)	75 (64-86)

headache (3% vs 15% and 18%; $P = .01$ and $P = .005$), and rhinoconjunctivitis (0% vs 16% and 7%; $P = .001$ and $P = .03$, respectively) (Fig 1, A). Interestingly, no significant differences ($>.05$) were found between otherISMs⁻ patients and ISMs⁺ cases for any of these symptoms (Fig 1, A). Noteworthy flushing (6% vs 40% and 63%; $P < .001$) and gastrointestinal symptoms (9% vs 24% and 38%; $P = .004$ and $P < .001$, respectively) outside acute episodes (ie, anaphylaxis) were also significantly less frequent among insectISMs⁻ cases versus both otherISMs⁻ and ISMs⁺ patients, respectively (Fig 1, B). In fact, MC-mediator release symptoms in between anaphylactic episodes were completely absent in 80% of insectISMs⁻ cases and were found in approximately one-half (47%) of otherISMs⁻ ($P < .001$) and in 11% of ISMs⁺ patients ($P < .001$) (Table II). By contrast, no significant differences ($P > .05$) were found among the 3 groups of ISM patients for the presence of organomegalies (9% in insectISMs⁻ vs 8% in otherISMs⁻ and 13% in ISMs⁺ cases) and osteoporosis (29% vs 26% and 16%, respectively) (Table II).

Laboratory features of ISMs⁻ cases with insect-induced anaphylaxis versus other ISM patients

Overall, ISMs⁻ patients showed increased median sBT levels (23.8 $\mu\text{g/L}$; range, 6.4-515 $\mu\text{g/L}$). Interestingly, sBT was significantly lower in insectISMs⁻ cases than in otherISMs⁻ and ISMs⁺ cases: median of 22.4 $\mu\text{g/L}$ (range, 6.4-217 $\mu\text{g/L}$) versus 28.7 $\mu\text{g/L}$ (range, 9.3-515 $\mu\text{g/L}$) and 45.8 $\mu\text{g/L}$ (range, 5.8-241 $\mu\text{g/L}$), respectively ($P = .009$ and $P < .001$, respectively) (Table II). Despite these differences, normal sBT levels ($<11.5 \mu\text{g/L}$) were detected in a similar proportion of insectISMs⁻ (10/143; 7%), otherISMs⁻ (5/72; 7%), and ISMs⁺ patients (3/56; 5%) (Table II). In turn, the median serum levels of IgE was significantly ($P = .04$) lower among insectISMs⁻ patients (29.3 KU/L; range, 1.7-793 KU/L) versus otherISMs⁻ cases (42.9 KU/L; range, 1-1194 KU/L) but not versus ISMs⁺ patients (27.5 KU/L; range, 1-296 KU/L) (Table II).

Overall, an underlying IgE-mediated mechanism responsible for acute MC-mediator release episodes was found in most ISMs⁻ cases (159/211; 75%); this finding being significantly more frequent ($P \leq .001$) among insectISMs⁻ patients (87%) than among both otherISMs⁻ (51%) and ISMs⁺ (55%) (Table II). Most interestingly, among those 154 ISM cases associated with anaphylaxis triggered by clearly identified wasp or bee sting with ($n = 16$) or without ($n = 139$) additional triggers, 14 patients (9%) had both negative skin and CAP test results, all such cases corresponding to ISMs⁻ patients (Table II). In addition, the median total IgE serum levels of these 14 patients was significantly ($P = .01$) lower than that of patients with IgE-mediated Hymenoptera-induced reactions: 15.9 KU/L (range, 1.7-201 KU/L) versus 37.1 KU/L (range, 5-793 KU/L), respectively.

TABLE II. Clinical and laboratory features of patients with ISMs⁻ associated with insect anaphylaxis (n = 143) versus other ISMs⁻ cases (n = 72) and ISMs⁺ cases associated with anaphylaxis (n = 56)

	OtherISMs ⁻ (n = 72)	P value	InsectISMs ⁻ (n = 143)	P value	ISMs ⁺ (n = 56)
Male, %	53	<.001	78	<.001	46
Median (range) age at onset (y)	38 (13-67)	.007	44 (16-76)	<.001	24 (<1-52)
Recurrent anaphylaxis, %	82	<.001	45	.001	71
MC-mediator release symptoms in between acute episodes, %	53	<.001	20	<.001	89
Organomegalies, %	8	NS	9	NS	13
Osteoporosis, %	26	NS	29	NS	16
Median (range) sBT levels (μg/L)	28.7 (9.3-515)	.009	22.4 (6.4-217)	<.001	45.8 (5.8-241)
sBT levels < 11.5 μg/L, %	7	NS	7	NS	5
sBT levels > 20 μg/L, %	69	NS	62	.01	80
Median (range) serum IgE levels (KU/L)	42.9 (1-1194)	.04	29.3 (1.7-793)	NS	27.5 (1-296)
IgE-mediated anaphylaxis, %*	49	<.001	84	<.001	21
Non-IgE-mediated wasp or bee anaphylaxis, %†	1	NS	9	NS	0

*Overall percentage of patients who showed positive allergy study results determined by CAP and/or skin tests.

†Percentage of patients who were able to clearly identify wasps or bees as triggers for anaphylaxis and showed negative allergy study results confirmed by both CAP and skin tests; in the remaining cases (n = 10; 7%) the allergy study was not available because the culprit insect was not identified. NS, Not significant.

Component-based determination of serum specific IgE antibodies to major Hymenoptera venom allergens among cases with a negative allergy study by means of skin tests and CAP determinations (n = 14) found positive results (>0.35 KU/L) in 7 of 11 patients (64%) who were studied by the ADVIA Centaur system with the use of natural allergens, but none of 3 who were studied by CAP with the use of recombinant antigens (Table III).

WHO criteria for SM among ISMs⁻ patients with insect-induced anaphylaxis versus other ISM patients

All 271 patients with ISM studied strictly fulfilled either the WHO major criterion plus ≥ 1 minor criteria (n = 154/271, 57%) or, in the absence of the major criterion, ≥ 3 minor criteria (n = 117/271; 43%) for SM. Overall, compact BM MC aggregates were less frequently observed among insectISMs⁻ patients versus both otherISMs⁻ and ISMs⁺ (46% vs 70% and 81%, respectively; $P \leq .001$) (Table IV). Similarly, the overall frequency of BM fibrosis was also significantly lower among insectISMs⁻ patients: 15% vs 30% ($P = .01$) and 46% ($P < .001$), respectively (Table IV). By contrast, no significant differences ($P > .05$) were observed among the 3 groups of patients for the frequency of morphologically abnormal, immunophenotypically aberrant, or *KIT*-mutated BM MCs (Table IV). Conversely, insectISMs⁻ patients more frequently ($P < .001$) showed a double BM MC population with coexisting normal (CD25⁺) and aberrant (CD25⁻) MCs (60% of cases) as assessed by flow cytometry than did the other 2 groups (35% of otherISMs⁻ and 16% of ISMs⁺ patients) (Table IV). In addition, multilineage (myeloid or myeloid plus lymphoid) involvement of BM hematopoiesis by the *KIT* mutation was never detected among insectISMs⁻ cases (0/60 cases; 0%), whereas it was present in 5 of 57 cases (9%) with otherISMs⁻ ($P = .02$ vs insectISMs⁻) and in 14 of 53 ISMs⁺ patients (26%) ($P < .001$ vs insectISMs⁻) (Table IV). Despite lower median sBT levels observed among patients with insectISMs⁻ than otherISMs⁻ cases, no statistically significant ($P > .05$) differences were found between both patient groups for the frequency of cases showing sBT levels of >20 μg/L

(62% vs 69%, respectively) (Table II). In contrast, patients with ISMs⁺ more frequently showed sBT levels of >20 μg/L (80%; $P = .01$ vs insectISMs⁻) (Table II).

DISCUSSION

Unlike ISMs⁺ cases, in whom the presence of typical skin lesions usually prompts the study of the BM to confirm the diagnosis of systemic disease, suspicion of mastocytosis in ISMs⁻ may be inconspicuous because patients present with a wide range of heterogeneous MC activation-related symptoms that frequently overlap with those of allergic diseases. This particularly involves patients with ISMs⁻ associated with Hymenoptera venom anaphylaxis, because many of them show hypersensitivity to Hymenoptera venom, sBT levels of <20 μg/L, sometimes in association with increased IgE serum levels.^{10,30,31} Therefore, these cases may be misinterpreted as just presenting an allergic condition with no further investigation being indicated to rule out an associated mastocytosis. Because mastocytosis is a well-known risk factor for adverse reactions to venom immunotherapy (VIT),³¹ the availability of efficient criteria for the identification of SM in patients with MCAS is mandatory.

REMA has proposed¹⁴ and validated¹⁵ a scoring system to predict for SM among patients who present with MC activation symptoms in the absence of skin lesions. This REMA score shows both a high overall sensitivity and specificity, superior to that of sBT.² In the present study, which includes the largest cohort of ISMs⁻ patients reported so far, we further validated the efficiency of the REMA score. Interestingly, our results show a better sensitivity of the REMA score among patients with systemic MC activation symptoms induced only by insects, in line with our previous observations in a significantly smaller patient series.¹⁴ These results indicate a consistent negative predictive value for SM of the REMA score in selecting for those patients with MCAS who have a low probability of an underlying SM and therefore, who might more safely undergo VIT. In turn, differences in the efficiency of the REMA score observed between patients with MCAS triggered exclusively by insects versus other agents also suggest that ISMs⁻ patients with insect-induced anaphylaxis may differ

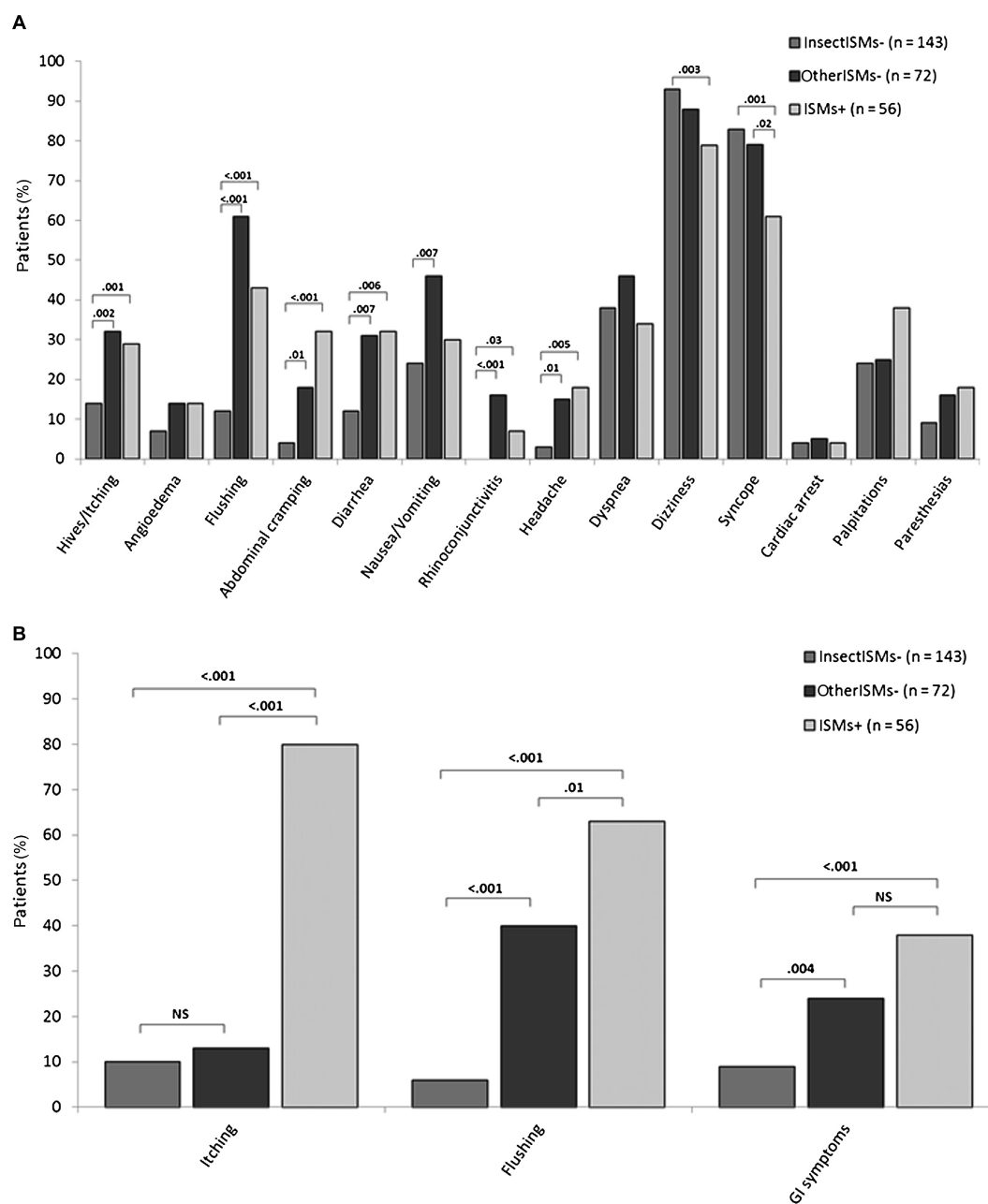


FIG 1. Distribution of clinical symptoms associated with the most severe MC-mediator release episode (**A**) and in between acute episodes (**B**) in patients with insectISMs⁻ (n = 143) versus otherISMs⁻ cases (n = 72) and ISMs⁺ patients (n = 56). Only clinical symptoms showing statistically significant differences ($P < .05$) among the different groups of patients are shown (**A**). GI, Gastrointestinal; NS, statistically not significant.

TABLE III. Total and specific IgE serum levels from 14 patients with ISMs[−] associated with vespid (wasp or bee)-induced anaphylaxis who showed both negative skin tests and ImmunoCAP analysis by using whole venom extracts

Case ID	Trigger	Total sIgE (KU/L)	Whole venom extracts by CAP (KU/L)			Individual venom components by Advia (KU/L)					
			Apis	Ves	Pol	Api m1	Api m2	Ves v1	Ves v5	Pol d1	Pol d5
SP005	W	27	0.04	0.01	0.09	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03	0.00
SP007	W	1.7	<0.10	0.22	0.12	0.13	0.03	0.14	0.12	0.00	0.07
SP021	W	28	0.02	0.03	0.07	0.04	0.00	0.00	0.00	0.88*	0.05
SP025	W	6.2	<0.10	0.12	<0.10	0.00	0.00	0.2	0.5*	0.00	0.00
SP026	W	27	<0.35	<0.35	<0.35	0.02	0.00	0.00	0.53*	0.00	0.09
SP040	W	55	0.04	0.03	0.16	0.00	0.00	0.00	0.00	0.08	0.02
SP042	W	16.8	0.01	0.05	0.29	0.00	0.00	0.11	0.00	1.33*	0.00
SP048	B	201	0.04	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.07	0.00	0.00
SP053	W,B	18	0.32	0.00	0.00	0.56*	0.16	0.01	0.03	0.04	0.04
SP057	W	6.3	0.03	0.05	0.18	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.09*
SP104	W	5.5	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.85*	0.00	0.00
IT002	W	15	<0.35	<0.35	<0.35	0.00‡	NA‡	NA‡	0.00‡	NA‡	0.03‡
IT019	W	2.1	<0.35	<0.35	<0.35	0.03‡	NA‡	NA‡	0.01‡	NA‡	0.00‡
IT046	B	5.4	<0.35	<0.35	<0.35	0.03‡	NA‡	NA‡	0.00‡	NA‡	0.00‡

Api, *Apis mellifera*; B, bee; NA, not available; Pol, *Polistes dominulus*; Ves, *Vespula*; W, wasp.

*Positive values (>0.35 KU/L).

‡Determined by CAP (KU/L) using recombinant antigens.

TABLE IV. Bone marrow features of patients with ISMs[−] associated with insect anaphylaxis (n = 143) versus other ISMs[−] cases (n = 72) and ISMs⁺ cases associated with anaphylaxis (n = 56)

	OtherISMs [−] (n = 72)	P value	InsectISMs [−] (n = 143)	P value	ISMs ⁺ (n = 56)
Immunohistochemistry					
Compact BM MC aggregates (>15 MCs per cluster), %	70	.001	46	<.001	81
Lymphoid aggregates, %	41	NS	27	<.001	55
Fibrosis, %	30	.01	15	<.001	46
Bone sclerosis, %	2	NS	3	NS	6
Cytomorphology					
>25% of spindled-shaped BM MCs, %	99	NS	96	NS	100
Eosinophilia, %	38	NS	33	NS	35
MEL lesions, %	28	NS	38	NS	51
Dysplasia, %	4	NS	3	NS	7
FCM immunophenotype of BM MCs					
CD25 ⁺ BM MCs, %	100	NS	99	NS	100
Double BM MC population, %	35	<.001	60	<.001	16
Percentage of BM MCs (%), median (range)	0.090 (0.0007-0.99)	NS	0.064 (0.0007-1.0)	.03	0.12 (0.003-1.7)
Percentage of aberrant BM MCs (%), median (range)	0.078 (0.0007-0.99)	NS	0.056 (0.0006-1.0)	NS	0.11 (0.003-1.7)
Molecular markers					
D816V <i>KIT</i> mutation, %	95	NS	96	NS	98
Other <i>KIT</i> mutations, %*	5	NS	2	NS	0
Multilineage <i>KIT</i> mutation, %	9	.02	0	<.001	26

FCM, Flow cytometry; MEL, mast cell plus eosinophil plus lymphocyte; NS, not significant.

**KIT* mutations other than D816V included D816H (1 case in each ISMs[−] group), D816Y (1 case in each ISMs[−] group), and Ins815-816 (1 insectISMs[−] case).

significantly from other ISMs[−] cases, as suggested by our preliminary observations.¹⁴

Previous studies have shown that, beyond the absence of skin lesions, patients with ISMs[−] display unique demographic, clinical, and laboratory characteristics that differ significantly from ISMs⁺ cases. These included a marked male predominance, a lower frequency of MC activation symptoms in between acute episodes, lower sBT levels, a greater frequency of cases with coexisting populations of phenotypically normal and aberrant MC in the BM by flow cytometry, and a lower frequency of multilineage *KIT* mutation.¹⁴ In the present study we show that all these distinctive features between ISMs[−] and ISMs⁺ patients strongly rely on their association with ISMs[−] cases who

presented with anaphylaxis triggered exclusively by insects (insectISMs[−]), but not on ISMs[−] cases associated with other triggers (otherISMs[−]). Male predominance of insectISMs[−] patients may potentially be explained by the increased risk of occupational exposure to insects (eg, beekeepers or farm workers) among the male population because of traditional social roles in rural areas from southern Europe. Such male predominance could also contribute to explain, at least in part, the higher sensitivity, but lower specificity, of the REMA score for the diagnosis of insectISMs[−] versus otherISMs[−] cases, because sex is a relevant factor in this scoring system. In turn, the lower sBT levels observed in this group of patients (compared with otherISMs[−] and ISMs⁺ patients) could be related to a lower total MC burden.

In fact, insectISM[−] patients also showed a significantly lower frequency of dense compact MC aggregates in BM sections in association with a higher frequency of cases with coexisting CD25[−] (normal) and CD25⁺ (aberrant) BM MCs and absence of multilineage *KIT* mutation versus the other 2 groups of ISM patients. Altogether, the above findings support the notion that highly sensitive diagnostic methods (eg, multiparameter flow cytometric immunophenotyping and analysis of the *KIT* mutational status on highly purified BM MCs) should be routinely applied in these patients to avoid false-negative results.³² The relatively high frequency of ISMs[−] patients with insect-induced anaphylaxis carrying sBT of <20 µg/L (ie, more than one-third of cases) is in agreement with previous data¹⁰ and supports the notion that lower sBT cutoff values could be used as a minor diagnostic criterion for SM, at least among these patients. A potential explanation for the lower sBT levels found in insectISM[−] patients versus otherISM[−] and ISMs⁺ cases might also be the lower clonal MC load observed in the former group of patients. Alternatively, a greater threshold for chronic nonspecific MC activation could exist in these patients, which is supported by their lower frequency of MC-mediator release symptoms outside anaphylactic episodes and the lower serum levels of total and specific IgE, the latter being undetectable in a significant proportion of cases as discussed further below. In line with this latter hypothesis, insectISM[−] patients also showed a different clinical profile during acute episodes versus otherISM[−] and ISMs⁺ cases associated with anaphylaxis, which consisted of a significantly lower frequency of urticaria, rhinoconjunctivitis, headache, flushing, and gastrointestinal symptoms. Whether such clinical differences could be related to the release of distinct profiles of MC mediators remains unknown and deserves further investigations.

Although an overall similar frequency of *KIT* mutation was found in insectISM[−], otherISM[−], and ISMs⁺ cases, *KIT* mutation was systematically restricted to the BM MC compartment in the former group of ISMs[−] patients, whereas multilineage *KIT* mutation was significantly more frequent among otherISM[−] and ISMs⁺ cases. As previously reported in a large series of SM,^{33,34} this pattern of MC-restricted involvement of hematopoiesis by the *KIT* mutation is associated with a lower tumor burden and confers a particular good prognosis in terms of progression-free survival to ISM patients. Despite all this, a paradox exists between the lower MC tumor load and the frequency of anaphylaxis among insectISM[−] patients compared with other ISM cases. Although there is no definitive explanation for such apparent discrepancy, the risk of insect-induced anaphylaxis in ISMs[−] patients could be related to the development of specific IgE against venoms with a high affinity, the direct presence of insect venom in the blood stream, and/or its binding to IgE present on the surface of perivascular mast cells; all these factors may potentially contribute to the development of life-threatening reactions that facilitate early diagnosis of mastocytosis in ISMs[−] cases. However, further studies are required to elucidate the unique clinical features of this particular group of ISM patients. On top of this, there is a bias in the fact that all patients with insectISM[−] have been studied because of insect-induced anaphylaxis, whereas the presenting symptom that prompted the study among most of the other SM cases mainly includes the presence of skin lesions and MC-activation symptoms triggered by factors other than insects.

At present, it is well known that an association exists between Hymenoptera anaphylaxis with a negative allergy study and the presence of an underlying SM.^{10,35-37} Among these cases, basophil-activation tests have shown contradictory results.^{38,39} Because of this, alternative mechanisms for antigen-induced anaphylaxis involving non-IgE-mediated MC activation have been postulated; these mechanisms include complement activation,^{40,41} calcitonin gene-related peptide overproduction,⁴² and/or dysfunction of the renin-angiotensin system.^{43,44} Of note, two-thirds of our ISMs[−] cases associated with Hymenoptera sting anaphylaxis with both negative skin tests and CAP results showed specific IgE against major (natural) allergens with the use of the ADVIA Centaur immunoassay. These results indicate that coexistence of both negative skin tests and specific IgE serum determinations are particularly frequent among ISMs[−] patients, who usually show low total serum IgE levels; in addition, they point out the potentially greater sensitivity of biotinylated natural allergens subjected to ADVIA analyses (ALK-Abelló, Madrid, Spain) versus recombinant allergens in component-based allergy testing reported by other groups,¹⁸ as well as the need for further prospective studies in larger series of patients in which the ADVIA Centaur analyses are compared with other techniques analyzing extended panels of vespid allergens, including nPol d1 (2/11 positive cases analyzed by the ADVIA system in our series). Altogether, these observations provide evidence about the potential utility of component-based allergy testing methods with the use of natural allergens analyzed by the ADVIA system in patients with ISMs[−] associated with Hymenoptera anaphylaxis with a negative allergy workup by means of more conventional methods; nevertheless, the true role of component allergens in sensitization deserves definitive demonstration in future prospective studies, because of methodologic differences between the CAP and ADVIA techniques. Because a higher risk of severe (even fatal) reactions exists among untreated patients with SM with history of Hymenoptera venom anaphylaxis,^{10,45-47} and VIT is an efficient therapeutic approach with low toxicity in SM,^{31,48-50} it seems reasonable to consider evaluating such therapy in this subgroup of patients within future prospective clinical trials.

In summary, the results here presented indicate that previously reported demographic, clinical, and laboratory differences between ISMs[−] and ISMs⁺ are most likely due to the association of such features with ISMs[−] cases with insect-induced anaphylaxis. Therefore, compared with ISMs⁺ patients as well as with other ISMs[−] patients, ISMs[−] cases associated with insect-induced anaphylaxis show a clear male predominance in association with a unique pattern of MC-related symptoms, and a low tumor burden, as reflected by lower sBT levels, a lower frequency of dense multifocal BM MC aggregates, increased coexistence of immunophenotypically aberrant and normal MCs in the BM, and systematic absence of multilineage involvement of hematopoiesis by the *KIT* mutation. Altogether, these findings indicate that ISMs[−] associated with insect-induced anaphylaxis may represent a unique clinical subtype of SM, with a remarkably low MC load that requires usage of the most sensitive and specific diagnostic techniques for the immunophenotypic and molecular analysis of BM MCs, to confirm the clonal nature of the disease. In addition, our results also suggest that true Hymenoptera sensitization can be demonstrated by the measurement of specific IgE against venom components in a significant proportion of cases who appear to be non-IgE

mediated by means of conventional methods, opening a door for evaluating the potential benefits of VIT in this subgroup of ISMs⁺ cases.

We thank the following physicians in Spain and Italy for their kind collaboration: Dr M. I. Esteban, Dr M. B. Mateo, Dr M. D. Alonso, Dr M. T. Caballero, Dr M. I. Rodríguez Cabrerós, Dr A. Prieto, Dr N. Prior, Dr B. de la Hoz, Dr A. Moreno Ancillo, Dr M. T. Lizaso, Dr M. D. Herrero, Dr M. Chamorro, Dr S. Echechipía, Dr A. Rosado, Dr M. D. del Pozo, Dr M. Fernández Rivas, Dr M. M. Moro, Dr S. Juste, Dr A. Henríquez, Dr E. González Seco, Dr E. Gómez Torrijos, Dr M. Fuentes, Dr A. A. Vasquez, Dr M. Martínez San Irineo, Dr G. Dávila, Dr C. Fernández, Dr C. Moreno, Dr P. J. Panadero, Dr M. T. Belver, Dr M. A. Tejedor, Dr J. Jurado, Dr I. Pérez de Pedro, Dr A. Abengózar, Dr E. J. Grau, Dr J. M. Beitia, Dr E. González Mancebo, Dr M. P. Berges, Dr A. Fernández Villamor, Dr L. Simioni, Dr E. Cavallucci, Dr A. Scarpa, Dr F. Lodi Rizzini, Dr F. Reccardini, Dr M. T. Constantino, Dr C. Tosoni, Dr G. Marcer, Dr L. Tasin, Dr F. Chieco Bianchi, Dr M. Franchini, Dr M. Busa, Dr C. Lombardo, Dr V. Pravettoni, Dr M. Mauro, Dr F. Murzilli, and Dr M. Crivellaro. We also thank Agustín Galán, Lucía Jimeno, and Rafael Monsalve (R&D, ALK-Abelló, Madrid, Spain) for their help with the ADVIA system measurements.

Clinical implications: Indolent systemic mastocytosis without skin lesions (ISM⁻) associated with insect-induced anaphylaxis displays unique clinical and biological features that differ significantly from features found in other ISMs⁺ patients and patients with ISM with skin lesions.

REFERENCES

- Nagata H, Worobec AS, Oh CK, Chowdhury BA, Tannenbaum S, Suzuki Y, et al. Identification of a point mutation in the catalytic domain of the protooncogene c-kit in peripheral blood mononuclear cells of patients who have mastocytosis with an associated hemologic disorder. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:10560-4.
- Longley BJ, Tyrrell L, Lu SZ, Ma YS, Langley K, Ding TG, et al. Somatic c-KIT activating mutation in urticaria pigmentosa and aggressive mastocytosis: establishment of clonality in a human mast cell neoplasm. *Nature Genet* 1996;12:312-4.
- Longley BJ Jr, Metcalfe DD, Sharp M, Wang XM, Tyrrell L, Lu SZ, et al. Activating and dominant inactivating c-KIT catalytic domain mutations in distinct clinical forms of human mastocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:1609-14.
- Yavuz AS, Lipsky PE, Yavuz S, Metcalfe DD, Akin C. Evidence for the involvement of a hematopoietic progenitor cell in systemic mastocytosis from single-cell analysis of mutations in the c-kit gene. *Blood* 2002;100:661-5.
- Pardanani A, Reeder T, Li CY, Tefferi A. Eosinophils are derived from the neoplastic clone in patients with systemic mastocytosis and eosinophilia. *Leuk Res* 2003;27:883-5.
- García-Montero AC, Jara-Acevedo M, Teodosio C, Sánchez ML, Nunez R, Prados A, et al. KIT mutation in mast cells and other bone marrow haematopoietic cell lineages in systemic mast cell disorders. A prospective study of the Spanish Network on Mastocytosis (REMA) in a series of 113 patients. *Blood* 2006;108:2366-72.
- Valent P, Sperr WR, Schwartz LB, Horny HP. Diagnosis and classification of mast cell proliferative disorders: delineation from immunologic diseases and non-mast cell hematopoietic neoplasms. *J Allergy Clin Immunol* 2004;114:3-11.
- Valent P, Akin C, Escribano L, Födinger M, Hartmann K, Brockow K, et al. Standards and standardization in mastocytosis: consensus statements on diagnostics, treatment recommendations and response criteria. *Eur J Clin Invest* 2007;37:435-53.
- Álvarez-Twose I, González de OD, Sánchez-Munoz L, Teodosio C, Jara-Acevedo M, Sánchez-Matas I, et al. Clinical, biological and molecular characteristics of mast cell activation disorders: a prospective study in 62 patients by the Spanish Network on Mastocytosis (REMA). *J Allergy Clin Immunol* 2009;123:S141.
- Bonadonna P, Perbellini O, Passalacqua G, Caruso B, Colarossi S, Dal FD, et al. Clonal mast cell disorders in patients with systemic reactions to Hymenoptera stings and increased serum tryptase levels. *J Allergy Clin Immunol* 2009;123:680-6.
- Zanotti R, Bonadonna P, Bonifacio M, Artuso A, Skena D, Rossini M, et al. Isolated bone marrow mastocytosis: an underestimated subvariant of indolent systemic mastocytosis. *Haematologica* 2011;96:482-4.
- Sánchez-Munoz L, Álvarez-Twose I, García-Montero AC, Teodosio C, Jara-Acevedo M, Pedreira CE, et al. Evaluation of the WHO criteria for the classification of patients with mastocytosis. *Mod Pathol* 2011;24:1157-68.
- Álvarez-Twose I, Morgado JM, Sánchez-Munoz L, García-Montero A, Mollejo M, Orfao A, et al. Current state of biology and diagnosis of clonal mast cell diseases in adults. *Int J Lab Hematol* 2012;34:445-60.
- Álvarez-Twose I, González de Olano D, Sánchez-Munoz L, Matito A, Esteban-Lopez MI, Vega A, et al. Clinical, biological and molecular characteristics of systemic mast cell disorders presenting with severe mediator-related symptoms. *J Allergy Clin Immunol* 2010;125:1269-78.
- Álvarez-Twose I, González-de-Olano D, Sánchez-Munoz L, Matito A, Jara-Acevedo M, Teodosio C, et al. Validation of the REMA score for predicting mast cell clonality and systemic mastocytosis in patients with systemic mast cell activation symptoms. *Int Arch Allergy Immunol* 2011;157:275-80.
- Horny HP, Metcalfe DD, Bennett JM, Bain BJ, Akin C, Escribano L, et al. Mastocytosis. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, editors. *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. Lyon, France: IARC; 2008. p. 54-63.
- Position paper: allergen standardization and skin tests. The European Academy of Allergy and Clinical Immunology. *Allergy* 1993;48:48-82.
- Monsalve RI, Vega A, Marques L, Miranda A, Fernandez J, Soriano V, et al. Component-resolved diagnosis of vespid venom-allergic individuals: phospholipases and antigen 5s are necessary to identify Vespula or Polistes sensitization. *Allergy* 2012;67:528-36.
- Escribano L, García-Montero A, Sánchez-Munoz L, Teodosio C, Álvarez-Twose I, Jara-Acevedo M, et al. Diagnosis of adult mastocytosis: role for bone marrow analysis. In: Kotke-Marchant K, Davis B, editors. *Laboratory Hematology Practice*. London, UK: Wiley-Blackwell; 2012. p. 388-98.
- Sperr W, Escribano L, Jordan JH, Scherthaner GH, Kundi M, Horny HP, et al. Morphologic properties of neoplastic mast cells: delineation of stages of maturation and implication for cytological grading of mastocytosis. *Leuk Res* 2001;25:529-36.
- Horny HP, Sillaber C, Menke D, Kaiserling E, Wehrmann M, Stehberger B, et al. Diagnostic value of immunostaining for tryptase in patients with mastocytosis. *Am J Surg Pathol* 1998;22:1132-40.
- Horny HP, Valent P. Diagnosis of mastocytosis: general histopathological aspects, morphological criteria, and immunohistochemical findings. *Leuk Res* 2001;25:543-51.
- Krokowski M, Sotlar K, Krauth MT, Födinger M, Valent P, Horny HP. Delineation of patterns of bone marrow mast cell infiltration in systemic mastocytosis: value of CD25, correlation with subvariants of the disease, and separation from mast cell hyperplasia. *Am J Clin Pathol* 2005;124:560-8.
- Escribano L, Orfao A, Diaz-Agustin B, Villarrubia J, Cervero C, Lopez A, et al. Indolent systemic mast cell disease in adults: immunophenotypic characterization of bone marrow mast cells and its diagnostic implications. *Blood* 1998;91:2731-6.
- Escribano L, Diaz-Agustin B, López A, López RN, García-Montero A, Almeida J, et al. Immunophenotypic analysis of mast cells in mastocytosis: when and how to do it. Proposals of the Spanish network on mastocytosis (REMA). *Cytometry B Clin Cytom* 2004;58B:1-8.
- Sánchez-Munoz L, Teodosio C, Morgado JM, Escribano L. Immunophenotypic characterization of bone marrow mast cells in mastocytosis and other mast cell disorders. *Methods Cell Biol* 2011;103:333-59.
- Sotlar K, Escribano L, Landt O, Möhrle S, Herrero S, Torrelo A, et al. One-step detection of c-kit point mutations using PNA-mediated PCR-clamping and hybridization probes. *Am J Pathol* 2003;162:737-46.
- Lawley W, Hird H, Mallinder P, McKenna S, Hargadon B, Murray A, et al. Detection of an activating c-kit mutation by real-time PCR in patients with anaphylaxis. *Mutat Res Fundam Mol Mech Mutagen* 2005;572:1-13.
- Sampson HA, Munoz-Furlong A, Campbell RL, Adkinson NF Jr, Bock SA, Branum A, et al. Second symposium on the definition and management of anaphylaxis: summary report—Second National Institute of Allergy and Infectious Disease/Food Allergy and Anaphylaxis Network symposium. *J Allergy Clin Immunol* 2006;117:391-7.
- González de Olano D, de la Hoz B, Nunez-Lopez R, Sánchez-Munoz L, Cuevas M, Dieguez C, et al. Prevalence of allergy and anaphylactic symptoms in 210 adult and pediatric patients with mastocytosis in Spain: a study of the Spanish network on mastocytosis (REMA). *Clin Exp Allergy* 2007;37:1547-55.
- González-de-Olano D, Álvarez-Twose I, Vega A, Orfao A, Escribano L. Venom immunotherapy in patients with mastocytosis and hymenoptera venom anaphylaxis. *Immunotherapy* 2011;3:637-51.

32. Alvarez-Twose I, Matito A, Sanchez-Munoz L, Morgado JM, Orfao A, Escibano L, et al. Contribution of highly sensitive diagnostic methods to the diagnosis of systemic mastocytosis in the absence of skin lesions. *Allergy* 2012;67:1190-1.
33. Escibano L, Alvarez-Twose I, Sanchez-Munoz L, Garcia-Montero A, Nunez R, Almeida J, et al. Prognosis in adult indolent systemic mastocytosis: a long-term study of the Spanish Network on Mastocytosis in a series of 145 patients. *J Allergy Clin Immunol* 2009;124:514-21.
34. Teodosio C, Garcia-Montero AC, Jara-Acevedo M, Alvarez-Twose I, Sanchez-Munoz L, Almeida J, et al. An immature immunophenotype of bone marrow mast cells predicts for multilineage D816V KIT mutation in systemic mastocytosis. *Leukemia* 2012;26:951-8.
35. Kosnik M. Anaphylaxis to venom without IgE antibody. *Allergy* 2000;55:676-7.
36. Golden DB, Tracy JM, Freeman TM, Hoffman DR. Negative venom skin test results in patients with histories of systemic reaction to a sting. *J Allergy Clin Immunol* 2003;112:495-8.
37. Kranke B, Sturm G, Aberer W. Negative venom skin test results and mastocytosis. *J Allergy Clin Immunol* 2004;113:180-1.
38. Gonzalez-de-Olano D, Alvarez-Twose I, Morgado JM, Lopez MI, Castro AV, Diaz D, et al. Evaluation of basophil activation in mastocytosis with hymenoptera venom anaphylaxis. *Cytometry B Clin Cytom* 2011;80:167-75.
39. Bonadonna P, Zanotti R, Melioli G, Antonini F, Romano I, Lenzi L, et al. The role of basophil activation test in special populations with mastocytosis and reactions to hymenoptera sting. *Allergy* 2012;67:962-5.
40. van der Linden PW, Hack CE, Kerckhaert JA, Struyvenberg A, van der Zwan JC. Preliminary report: complement activation in wasp-sting anaphylaxis. *Lancet* 1990;336:904-6.
41. Kawabata Y, Yang TS, Yokochi TT, Matsushita M, Fujita T, Shibazaki M, et al. Complement system is involved in anaphylactoid reaction induced by lipopolysaccharides in muramyl dipeptide-treated mice. *Shock* 2000;14:572-7.
42. Volcheck GW, Butterfield JH, Yunginger JW, Klee GG. Elevated serum levels of calcitonin gene-related peptide in Hymenoptera sting-induced anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol* 1998;102:149-51.
43. Hermann K, Ring J. The renin-angiotensin system in patients with repeated anaphylactic reactions during hymenoptera venom hyposensitization and sting challenge. *Int Arch Allergy Immunol* 1997;112:251-6.
44. Niedoszytko M, Ratajska M, Chelminska M, Makowiecki M, Malek E, Sieminska A, et al. The angiotensinogen AGT p.M235T gene polymorphism may be responsible for the development of severe anaphylactic reactions to insect venom allergens. *Int Arch Allergy Immunol* 2010;153:166-72.
45. Dubois AE. Mastocytosis and Hymenoptera allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2004;4:291-5.
46. Wagner N, Fritze D, Przybilla B, Hagedorn M, Rueff F. Fatal anaphylactic sting reaction in a patient with mastocytosis. *Int Arch Allergy Immunol* 2008;146:162-3.
47. Muller UR. Elevated baseline serum tryptase, mastocytosis and anaphylaxis. *Clin Exp Allergy* 2009;39:620-2.
48. Bonadonna P, Zanotti R, Caruso B, Castellani L, Perbellini O, Colarossi S, et al. Allergen specific immunotherapy is safe and effective in patients with systemic mastocytosis and Hymenoptera allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2008;121:256-7.
49. Gonzalez de Olano D, Alvarez-Twose I, Esteban-Lopez MI, Sanchez-Munoz L, de Durana MD, Vega A, et al. Safety and effectiveness of immunotherapy in patients with indolent systemic mastocytosis presenting with Hymenoptera venom anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol* 2008;121:519-26.
50. Niedoszytko M, de Monchy J, Van Doormaal JJ, Jassem E, Oude Elberink JN. Mastocytosis and insect venom allergy: diagnosis, safety and efficacy of venom immunotherapy. *Allergy* 2009;64:1237-45.

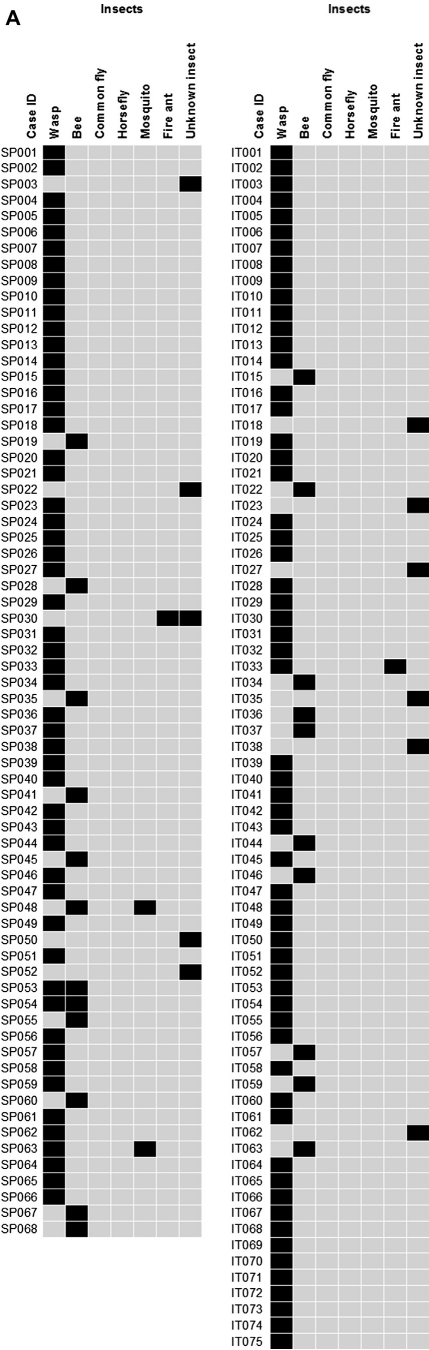
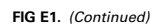


FIG E1. Distribution of different triggers involved in acute MC-mediator release episodes in patients with insectISMs⁺ (n = 143) (**A**), otherISMs⁺ (n = 72) (**B**), ISMs⁺ (n = 56) (**C**), and nonclonal MCAS (n = 64) (**D**). *Black boxes* indicate the specific trigger(s) for MC-mediator release episodes involved in every case, and *striped boxes* represent those fish-triggered cases in which hypersensitivity to *Anisakis simplex* was found by CAP and/or skin tests.



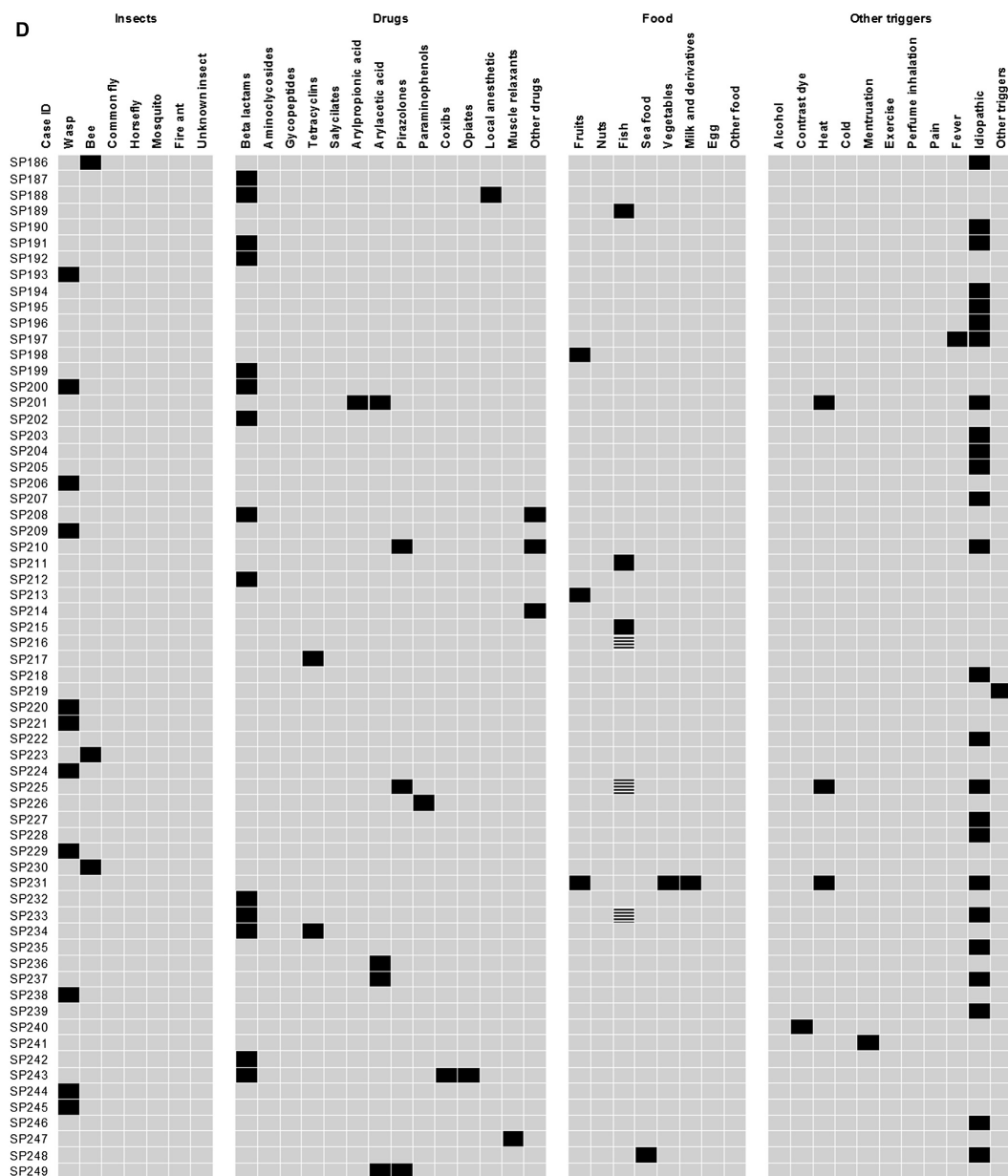


FIG E1. (Continued)

TABLE E1. Clinical and biochemical criteria used by the REMA score to predict for bone marrow mast cell clonality and systemic mastocytosis in patients who present with systemic mast cell-mediator release symptoms in the absence of skin lesions

Variable	Score
Gender	
Male	+1
Female	−1
Clinical symptoms	
Absence of urticaria, pruritus and angioedema	+1
Urticaria, pruritus and/or angioedema	−2
Presyncope and/or syncope	+3
Serum baseline tryptase	
<15 ng/mL	−1
>25 ng/mL	+2

Reprinted with permission from Álvarez-Twose et al.¹⁴

3.3. CARACTERIZACIÓN CLÍNICO-BIOLÓGICA DE LA WDSM Y SUS IMPLICACIONES PRONÓSTICAS Y TERAPÉUTICAS

3.3.1. CLINICAL, IMMUNOPHENOTYPIC, AND MOLECULAR CHARACTERISTICS OF WELL-DIFFERENTIATED SYSTEMIC MASTOCYTOSIS.

Iván Álvarez-Twose, María Jara-Acevedo, José Mário Morgado, Andrés García-Montero, Laura Sánchez-Muñoz, Cristina Teodósio, Almudena Matito, Andrea Mayado, Carolina Caldas, Manuela Mollejo, Alberto Orfao y Luis Escribano.

J Allergy Clin Immunol 2016;137(1):168-178.

Clinical, immunophenotypic, and molecular characteristics of well-differentiated systemic mastocytosis



Iván Álvarez-Twose, MD,^{a,b} María Jara-Acevedo, MSc,^{b,c} José Mário Morgado, MSc,^{a,b} Andrés García-Montero, PhD,^{b,c} Laura Sánchez-Muñoz, MD, PhD,^{a,b} Cristina Teodósio, PhD,^{b,c} Almudena Matito, MD, PhD,^{a,b} Andrea Mayado, PhD,^{b,c} Carolina Caldas, MSc,^{b,c} Manuela Mollejo, MD, PhD,^{b,d} Alberto Orfao, MD, PhD,^{b,c*} and Luis Escribano, MD, PhD^{b*}

Toledo and Salamanca, Spain

Background: Well-differentiated systemic mastocytosis (WDSM) is a rare variant of systemic mastocytosis (SM) characterized by bone marrow (BM) infiltration by mature-appearing mast cells (MCs) often lacking exon 17 *KIT* mutations. Because of its rarity, the clinical and biological features of WDSM remain poorly defined.

Objective: We sought to determine the clinical, biological, and molecular features of a cohort of 33 patients with mastocytosis in the skin in association with BM infiltration by well-differentiated MCs and to establish potential diagnostic criteria for WDSM. **Methods:** Thirty-three patients with mastocytosis in the skin plus BM aggregates of round, fully granulated MCs lacking strong CD25 and CD2 expression in association with clonal MC features were studied.

Results: Our cohort of patients showed female predominance (female/male ratio, 4:1) and childhood onset of the disease (91%) with frequent familial aggregation (39%). Skin involvement was heterogeneous, including maculopapular (82%), nodular (6%), and diffuse cutaneous (12%) mastocytosis. *KIT* mutations were detected in only 10 (30%) of 33 patients, including the *KIT* D816V (n = 5), K509I (n = 3), N819Y (n = 1), and I817V (n = 1) mutations. BM MCs displayed a unique immunophenotypic pattern consisting of increased light scatter features,

overexpression of cytoplasmic carboxypeptidase, and aberrant expression of CD30, together with absent (79%) or low (21%) positivity for CD25, CD2, or both. Despite only 9 (27%) of 33 patients fulfilling the World Health Organization criteria for SM, our findings allowed us to establish the systemic nature of the disease, which fit with the definition of WDSM.

Conclusions: WDSM represents a rare clinically and molecularly heterogeneous variant of SM that requires unique diagnostic criteria to avoid a misdiagnosis of cutaneous mastocytosis per current World Health Organization criteria. (J Allergy Clin Immunol 2016;137:168-78.)

Key words: Mast cell, mastocytosis, well differentiated, *KIT*, imatinib

Mastocytosis consists of a heterogeneous group of disorders characterized by the accumulation of clonal mast cells (MCs) in different organs and tissues often associated with MC mediator release symptoms. Seven variants of the disease plus a provisional subvariant are currently recognized by the World Health Organization (WHO) 2008 classification of mastocytosis¹: cutaneous mastocytosis (CM), indolent systemic mastocytosis (ISM), aggressive systemic mastocytosis (ASM), systemic mastocytosis with an associated clonal hematologic non-mast cell lineage disease (SM-AHNMD), mast cell leukemia (MCL), MC sarcoma, and extracutaneous mastocytoma, plus a provisional subvariant of ISM termed smoldering systemic mastocytosis (SSM).

In the WHO 2008 classification, systemic mastocytosis (SM) is defined by the presence of MC aggregates in the bone marrow (BM; major diagnostic criterion) in association with 1 or more minor criteria (morphologically atypical BM MCs, aberrant expression of CD25⁺ and/or CD2⁺, presence of *KIT* mutations at codon 816, and/or increased serum tryptase [sT] level >20 µg/L) or 3 or more of the above 4 minor criteria if MC aggregates are not detected.¹⁻³ In addition to SSM, recent reports have also identified a potential new subvariant of SM that has been termed well-differentiated systemic mastocytosis (WDSM). The few WDSM cases reported thus far have been shown to frequently have mature-appearing CD25^{low}/CD2^{low} BM MCs and to often lack on the D816V *KIT* mutation, therefore mimicking normal mature/differentiated MCs on both phenotypic and morphologic grounds.⁴⁻¹² This implies that 3 of the 4 minor WHO 2008 criteria for SM appear to be absent in this small subgroup of patients; in such a case, the presence of BM MC aggregates in association with increased sT levels would become a requirement for the diagnosis of SM per the WHO 2008 criteria among many patients with WDSM. However, preliminary results based on limited numbers of cases suggest that sT levels of less

From ^aInstituto de Estudios de Mastocitosis de Castilla La Mancha (CLMast), Hospital Virgen del Valle, Toledo; ^bthe Spanish Network on Mastocytosis (REMA), Toledo and Salamanca; ^cCentro de Investigación del Cáncer/IBMCC (USAL/CSIC) and IBSAL, Departamento de Medicina and Servicio General de Citometría-NUCLEUS, University of Salamanca; and ^dthe Pathology Department, Hospital Virgen de la Salud, Toledo.

*These authors have contributed equally to this work, and both should be considered last authors.

Supported by grants from Asociación Española de Mastocitosis, Madrid, Spain (grant AEDM 2014); Instituto de Salud Carlos III, FEDER, Ministry of Economy and Competitiveness, Madrid, Spain (grant PI11/02399); Fundación Ramón Areces, Madrid, Spain (grant CIVP16A1806); and Novartis Farmacéutica, S.A., Spain.

Disclosure of potential conflict of interest: I. Álvarez-Twose has received research support from Novartis Farmacéutica, S.A., Spain. A. García-Montero has received research support from Fundación Ramón Areces (grant no. CIVP16A1806) and ISCIII Ministerio de Economía y Competitividad (grant no. PI11/02399). A. Orfao has received research support from Fundación Ramón Areces (grant no. CIVP16A1806). The rest of the authors declare that they have no relevant conflicts of interest.

Received for publication January 17, 2015; revised April 17, 2015; accepted for publication May 7, 2015.

Available online June 19, 2015.

Corresponding author: Iván Álvarez-Twose, MD, Instituto de Estudios de Mastocitosis de Castilla La Mancha (CLMast), Hospital Virgen del Valle, Carretera de Cobisa s/n, 45071 Toledo, Spain. E-mail: ivana@sescam.jccm.es.

© The CrossMark symbol notifies online readers when updates have been made to the article such as errata or minor corrections

0091-6749/\$36.00
© 2015 American Academy of Allergy, Asthma & Immunology
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2015.05.008>

Abbreviations used

ASM:	Aggressive systemic mastocytosis
BM:	Bone marrow
CM:	Cutaneous mastocytosis
CPA:	Carboxypeptidase A
DCM:	Diffuse cutaneous mastocytosis
FACS:	Fluorescence-activated cell sorting
FSC:	Forward light scatter
GIST:	Gastrointestinal stromal tumor
HUMARA:	Human androgen receptor assay
ISM:	Indolent systemic mastocytosis
MC:	Mast cell
MCL:	Mast cell leukemia
MIS:	Mastocytosis in the skin
MPCM:	Maculopapular cutaneous mastocytosis
NM:	Nodular cutaneous mastocytosis
SM:	Systemic mastocytosis
SM-AHNMD:	Systemic mastocytosis associated with a clonal hematologic non-mast cell lineage disease
SSC:	Sideward light scatter
SSM:	Smoldering systemic mastocytosis
sT:	Serum tryptase
TKI:	Tyrosine kinase inhibitor
WDSM:	Well-differentiated systemic mastocytosis
WHO:	World Health Organization
XCIP:	X-chromosome inactivation pattern

than 20 $\mu\text{g/L}$ in the absence of other minor WHO 2008 diagnostic criteria can occur frequently in this group of patients with SM, despite clear systemic disease involvement (eg, skin lesions and BM MC infiltration).^{7,9} Altogether, these findings point out the need for refined (eg, additional) diagnostic criteria for patients with WDSM. This becomes particularly relevant because of the low frequency of codon 816 *KIT* mutations reported in these patients,⁶ which would make them potential candidates for *KIT*-targeted tyrosine kinase inhibitor (TKI) therapy, as supported by the dramatic response to imatinib observed in a few case reports.^{4,10-12}

In this study we describe in detail the clinical, biological, histopathologic, cytomorphologic, immunophenotypic, and molecular characteristics of a group of patients with mastocytosis who had BM infiltration by clonal MCs displaying well-differentiated MC features similar to those found in patients with previously reported WDSM.

METHODS**Patient selection and evaluation**

Of 855 patients who underwent a complete BM study at the Spanish Network on Mastocytosis between January 1997 and December 2013 because of suspected SM, 33 (4%; 6 male and 27 female patients) were included in this study on the basis of the following criteria: (1) diagnosis of mastocytosis in the skin (MIS) confirmed by skin biopsy according to consensus criteria²; (2) demonstration of a homogeneous population of round and well-granulated CD25^{low} and CD2^{low} MCs in the BM, as assessed by means of cytomorphology and flow cytometry, respectively; and (3) evidence for BM clonal MC disease, as defined by the demonstration of aggregates of 15 or more MCs per cluster in BM sections or BM smears, mutations involving any exon of the *KIT* gene in purified BM MCs, and/or a clonal X-chromosome inactivation pattern (XCIP) in purified BM MCs from female patients, as assessed by using the human androgen receptor assay (HUMARA).^{13,14} All patients (or parents in the case of children) provided written informed consent

to participate in the study, according to the Declaration of Helsinki. The study was approved by the Institutional Ethics Committee of the Complejo Hospitalario de Toledo (Toledo, Spain).

Diagnostic clinical and laboratory work-up included evaluation and classification of skin lesions according to updated WHO criteria,¹⁵ as well as recording clinical symptoms related to MC mediator release (eg, pruritus, flushing, palpitations, headache, abdominal cramping, diarrhea, hypotension, and syncope). sT levels (UniCAP; Pharmacia, Uppsala, Sweden) were measured at the time of BM studies. Bone mass density and the presence of organomegaly were evaluated by using dual energy x-ray absorptiometry and abdominal ultrasonography, computerized tomography, or both, respectively.

Skin histopathology

Formalin-fixed, paraffin-embedded skin biopsy specimens were stained for hematoxylin and eosin, c-kit, and tryptase; in most cases, CD25 and CD30 were also evaluated. Diagnosis of MIS was based on either the presence of aggregates of more than 15 MCs per cluster or scattered MCs exceeding 20 cells per microscopic high-power field ($\times 40$ magnification), according to consensus criteria.² The pattern of dermal distribution of MCs and the presence of promastocytes and non-MC lineage cells (eg, lymphocytes, neutrophils, and eosinophils) were also recorded.

BM studies

Diagnostic BM aspiration was systematically performed in every patient, and biopsy samples were obtained only from adult patients according to previously proposed recommendations.^{2,16-19} BM aspirate smears were stained for toluidine blue and May-Grünwald-Giemsa for cytomorphologic evaluation, whereas BM sections were stained for hematoxylin and eosin, tryptase, c-kit, reticulin, CD25, and CD30. Multiparameter flow cytometric immunophenotypic studies were performed on whole BM aspirated samples by using 4- to 8-color staining, according to well-defined consensus procedures.^{16,17,19} Screening for the *KIT* D816V mutation and other exon 17 *KIT* mutations was performed in genomic DNA from a fluorescence-activated cell sorting (FACS)-purified populations of BM MCs, eosinophils, neutrophils, lymphocytes, and CD34⁺ hematopoietic progenitor cells, as described elsewhere.^{6,20} Mutations involving other exons of the *KIT* gene were also investigated in purified BM MCs from those patients who showed no exon 17 *KIT* mutations (see Table E1 in this article's Online Repository at www.jacionline.org). Among these latter patients, MC clonality was also determined in FACS-purified BM MCs from 14 women (11 of whom had BM aggregates consisting of >15 MCs, mutations involving codons other than codon 17 of the *KIT* gene, or both) by using HUMARA.^{13,14}

Statistical methods

Medians and ranges were calculated for continuous variables, and frequencies were reported for categorical variables. Statistical significance of differences observed between groups of patients was assessed by using the Mann-Whitney *U* and χ^2 tests for continuous and categorical variables, respectively. The Pearson correlation coefficient test was used for correlation studies between 2 variables. All statistical analyses were assessed for statistical significance at a threshold *P* value of less than .05 and performed with the SPSS 17.0 software package (SPSS, Chicago, Ill).

RESULTS**Clinical presentation**

Median age at diagnosis of the 33 patients studied was 27 years (range, 2-72 years). Despite this, all but 3 (91%) patients had a pediatric onset (<14 years old) of skin lesions, skin lesions arose within the first year of life in nearly half of such cases (median age at onset of skin lesions, 3 years; range, birth to 60 years; Table 1), and first-degree familial aggregation was present in 13 (39%) patients (Table 1). The great majority of patients (27/33 [82%])

TABLE I. Clinical characteristics of patients with WDSM (n = 33)

Patient ID	Sex	Age at diagnosis*	Age at onset*	Familial aggregation	Cutaneous involvement			MC mediator release symptoms						
					Type	Distribution	Extension†	Pruritus (grade‡)	CV (grade‡)	GI (grade‡)	Anaphylaxis (frequency§)	Triggers of anaphylaxis	Organomegaly	BMD
1	F	26 y	4 y	Mother	MPCM	T+N	3	Yes (2)	Fl (2)	No	No	—	H	Normal
2	M	26 y	3 mo	No	MPCM	T+N+E	3	Yes (2)	Fl+P+S (4)	No	Yes (A)	NSAIDs	No	Normal
3	F	25 y	3 y	Brother	MPCM	T+N	2	No	Fl+P+D (2)	p (2)	No	—	No	Normal
4	F	26 y	4 y	No	MPCM	T+N	2	Yes (2)	Fl+P+D+S (4)	d,c (2)	Yes (A)	Idiopathic	No	Normal
5	F	44 y	41 y	No	MPCM	T	2	Yes (2)	No	No	No	—	No	Osteopenia
6	F	25 y	3 mo	No	MPCM	T+N+E	3	Yes (2)	No	d,c (2)	No	—	No	Normal
7	F	30 y	2 y	No	MPCM	T+N+E	2	Yes (2)	Fl (3)	No	No	—	No	Osteopenia
8	F	26 y	2 y	No	MPCM	T+N	2	Yes (2)	Fl+P+D (3)	d,p (2)	No	—	No	Normal
9	F	33 y	4 y	Son	MPCM	T+N	1	Yes (2)	Fl+P (3)	No	No	—	No	Not tested
10	F	29 y	1 y	Mother	MPCM	T+N	2	Yes (2)	No	No	No	—	No	Osteopenia
11	F	69 y	60 y	No	NM	E	1	No	Fl+P+Hyp+S (4)	No	Yes (B)	Idiopathic	No	Osteoporosis
12	F	24 y	1 y	No	MPCM	T+N	3	No	F (3)	No	No	—	H	Osteopenia
13	M	31 y	9 y	No	MPCM	T	1	Yes (2)	Fl+P (2)	No	No	—	No	Osteopenia
14	F	43 y	5 y	No	MPCM	T	1	Yes (2)	Fl+P+D (2)	No	Yes (A)	Idiopathic	No	Normal
15	F	24 y	6 y	No	MPCM	T+N	1	No	Fl (1)	No	No	—	No	Osteopenia
16	F	21 y	10 mo	No	MPCM	T+N	2	Yes (2)	Fl+P+D (2)	No	Yes (A)	Idiopathic	H	Normal
17	F	12 y	1 mo	No	MPCM‡	T+N+E	3	Yes (1)	Fl+S (2)	d (2)	Yes	Anesthesia	No	Osteopenia
18	F	21 y	14 y	No	MPCM	T+N	2	Yes (1)	Fl (1)	No	No	—	No	Normal
19	F	44 y	1 mo	Daughter	MPCM	T	1	Yes (1)	Fl (1)	No	No	—	No	Not tested
20	F	72 y	3 mo	No	MPCM§	T+N+E	4	Yes (3)	Fl+Hyp+S (4)	No	Yes (A)	Idiopathic	Sp	Osteoporosis
21	F	28 y	6 y	No	MPCM	T+N	1	No	Fl+P+D (1)	No	No	—	No	Osteoporosis
22	F	45 y	11 y	Daughter	MPCM	T	1	Yes (1)	Fl+P+D (1)	No	No	—	No	Normal
23	M	55 y	NB	Daughter (x2)	DCM	T+N+E	4	Yes (1)	No	d,p (1)	No	—	H	Normal
24	F	20 y	3 mo	Father, sister	DCM	T+N+E	4	Yes (2)	Fl (1)	d,p (1)	No	—	No	Normal
25	F	27 y	3 mo	Father, sister, son, daughter	DCM	T+N+E	4	Yes (2)	Fl (1)	d,c (2)	No	—	No	Normal
26	M	24 y	4 y	No	MPCM	T	1	Yes (1)	Fl+P (2)	No	No	—	No	Normal
27	F	18 y	3 y	Sister, brother	MPCM	T+N	2	No	No	No	No	—	No	Normal
28	F	22 y	5 y	No	MPCM	T+N	2	Yes (1)	Fl+P (1)	c (1)	No	—	No	Normal
29	F	67 y	5 y	Daughter	MPCM	T	1	Yes (1)	Fl (1)	No	No	—	No	Normal
30	F	40 y	NB	Daughter	MPCM	T+N	2	Yes (2)	Fl+D (2)	c,p (2)	Yes (A)	NSAIDs	No	Osteopenia
31	F	39 y	6 y	Daughter	MPCM	T+N	2	Yes (1)	Fl+P+D (2)	No	No	—	No	Normal
32	M	41 y	NB	No	DCM	T+N+E	4	Yes (1)	Fl (1)	No	No	—	No	Normal
33	M	2 y	NB	No	NM	T+N+E	4	Yes (3)	Fl+P+Hyp+S (4)	d,c (2)	Yes (C)	Idiopathic	H, Sp	Not tested
Total	F: 27 (82%)	27 y (2-72 y)‡	Childhood onset: 30 (91%)	13 (39%)	MPCM: 27 (82%)	T±N: 32 (97%)		27 (82%)	28 (85%)	11 (33%)	9 (27%)		6 (18%)	Bone mass loss: 11 (37%)

BMD, Bone mass density; c, abdominal cramping; CV, cardiovascular symptoms; D, dizziness; d, diarrhea; E, extremities; F, female; Fl, flushing; GI, gastrointestinal symptoms; H, hepatomegaly; Hyp, hypotension; M, male; N, neck; NB, newborn; NM, nodular mastocytosis; NSAID, nonsteroidal anti-inflammatory drug; P, palpitations; p, peptic symptoms; S, syncope; Sp, splenomegaly; T, trunk.

*In years, unless otherwise specified.

†Extension of cutaneous involvement was graded as follows: (1) skin lesions involving less than 5% of the body surface area, (2) skin lesions involving 5% to 25% of the body surface area, (3) skin lesions involving 25% to 50% of the body surface area, and (4) skin lesions involving greater than 50% of the body surface area.

‡The patient showed a gradual improvement in her skin lesions until they completely disappeared 3 years before the BM study.

§The patient had additional multiple mastocytomas located in her underarms and inner thighs, which emerged several months before she was referred for the BM study.

||Expressed in medians (ranges).

¶According to standardized consensus recommendations (see Valent et al² for more details): grade 1, mild, no therapy required; grade 2, moderate, kept under control with antimedator-type drugs; grade 3, severe, not sufficiently controlled with therapy; and grade 4, severe adverse event, requires emergency therapy and hospitalization.

#Frequency A, <1/y; frequency B, >1/y and <1/mo; frequency C, >1/mo.

had maculopapular cutaneous mastocytosis (MPCM), 4 (12%) patients had diffuse cutaneous mastocytosis (DCM), and 2 (6%) patients had nodular cutaneous mastocytosis (NM; Table I). MPCM skin lesions were small (usually <0.5 cm) brown to reddish macules and papules with variable degrees of extent (from isolated to multiple skin lesions), and they mainly involved the trunk and neck, whereas the extremities were often free of lesions (Table I). Compared with other body areas, MPCM lesions involving the neck were usually more elevated and showed a (micro)nodular macroscopic appearance (Fig 1, A). Patients with DCM presented with generalized thickening of the skin and exaggeration in skin folds, particularly in underarm skin, in the absence of individual hyperpigmented skin lesions

(Fig 1, B). The only 2 patients with NM were a 69-year-old woman with an adult-onset solitary mastocytoma of 8 × 5 cm in diameter located in her right arm that had been surgically removed before diagnosis and a 2-year-old child with neonatal multiple nodular lesions involving more than 90% of his body surface area (Fig 1, C). Of note, skin lesions at referral were observed in all but 1 patient, who showed gradual improvement of her skin lesions until they completely disappeared 3 years before the BM study.

The most frequent MC mediator release symptom was flushing (85% of patients), which presented as recurrent episodes usually accompanied by other vasodilatory symptoms (eg, palpitations, dizziness, headache, hypotension, or syncope), followed by

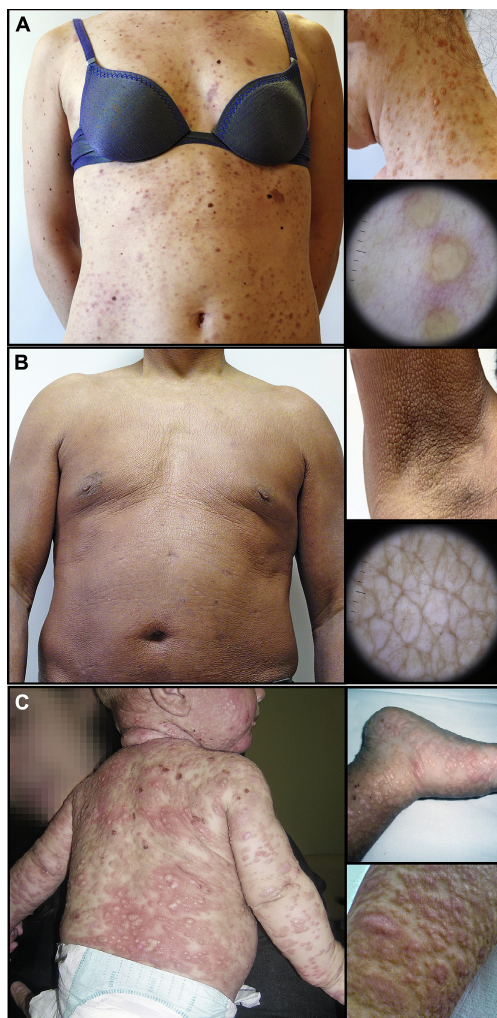


FIG 1. Different types of cutaneous involvement detected in patients with WDSM. **A**, MPCM in a 24-year-old woman (patient 2). Skin lesions in the neck mimicked micronodules and showed a yellow-orange blot dermoscopic pattern. **B**, DCM in a 55-year-old man (patient 23) who presented with generalized thickening of the skin with accentuation of folds that was particularly evident in the underarm skin. **C**, Extensive NM in a 2-year-old boy (patient 33) who had increased sT levels (121 $\mu\text{g/L}$) at diagnosis, probably reflecting the extensive cutaneous involvement coexisting with severe MC activation events.

pruritus (82%). Fourteen (42%) patients fulfilled the criteria for anaphylaxis (Table I). Overall, chronic gastrointestinal symptoms were observed in 33% of patients, and these included diarrhea (24%), abdominal cramping (21%), and dyspepsia (16%). Mild organomegaly was detected in 6 (18%) of 33 patients, and bone mass loss was detected in 11 (37%) of 30 patients, 3 cases of which corresponded to osteoporosis. It is of note that bone mass

loss was detected at ages of less than 45 years in 9 (82%) of 11 patients (Table I). No patients presenting with bone sclerosis were identified (Table I).

Skin histology

Abnormally increased numbers of mature-appearing dermal MCs with a predominantly round/polygonal shape and fully granulated cytoplasm, either forming large aggregates of more than 15 MCs per cluster (94%) or distributed in a scattered fashion (6%), which is consistent with cutaneous involvement by mastocytosis, were found in every patients. In most (72%) patients dermal binucleated or polynucleated promastocytes were also identified, and variable numbers of eosinophils, lymphocytes, or polymorphonuclear cells were observed within the MC infiltrate in a subset of patients (9/33 [27%]). Overall, 3 different histopathologic patterns were recognized (Fig 2): (1) an interstitial/perivascular pattern ($n = 14$) characterized by MC infiltrates forming strands between collagen bundles and surrounding blood vessels, predominantly in the papillary dermis and upper reticular dermis; (2) a nodular pattern ($n = 8$) consisting of dense aggregates of MCs forming large and well-delimited nests of MCs mainly located within the reticular dermis and usually accompanied by variable numbers of scattered MCs after an interstitial distribution and also forming strands between collagen bundles; and (3) a sheet-like pattern ($n = 11$) with a diffuse MC infiltrate involving most of the papillary and reticular dermis, which eventually extended deep into the subcutaneous tissue. Immunohistochemical staining for CD25 showed weak to moderate membrane positivity in only 4 (17%) of 24 cases tested; in turn, CD30 was positive in 16 (70%) of 23 cases tested, with a weak ($n = 10$) to moderate/strong ($n = 6$) pattern of expression.

Morphologic, immunophenotypic, and molecular characteristics of BM MCs

BM MCs from all 33 patients systematically showed a round and well-granulated mature appearance, with a greater size than normal MCs from subjects without mastocytosis (Fig 3). Examination of BM sections revealed 3 main patterns of MC infiltration: (1) an interstitial pattern ($n = 4$) characterized by loosely scattered BM MCs without forming aggregates, (2) a focal pattern ($n = 24$) characterized by compact BM MC aggregates accompanied by a variable number of loosely scattered MCs, and (3) a diffuse pattern ($n = 4$) consisting of a diffuse-compact infiltration of the BM. Of note, BM MCs from cases with an interstitial or focal histologic pattern of BM infiltration typically showed an intertrabecular localization, with only 4 patients also showing perivascular distribution of BM MCs. Overall, dense compact MC aggregates (eg, >15 MCs per cluster) were detected in 21 (66%) of 32 patients and subdiagnostic aggregates (eg, median of 6 MCs per cluster; range, 2-14) in another 7 (22%) patients (Fig 3 and Table II). Cytologic examination of BM smears revealed large MC aggregates within BM particles in 27 (82%) of 33 patients, including 8 without MC aggregates detectable by means of immunohistochemistry and 1 pediatric patient in whom a BM biopsy was not performed (Fig 3 and Table II). In 28 (85%) of 33 patients, clusters of 2 to 3 MCs were found outside BM particles, and in 4 (12%) patients MCs represented more than 20% of all nucleated cells in BM

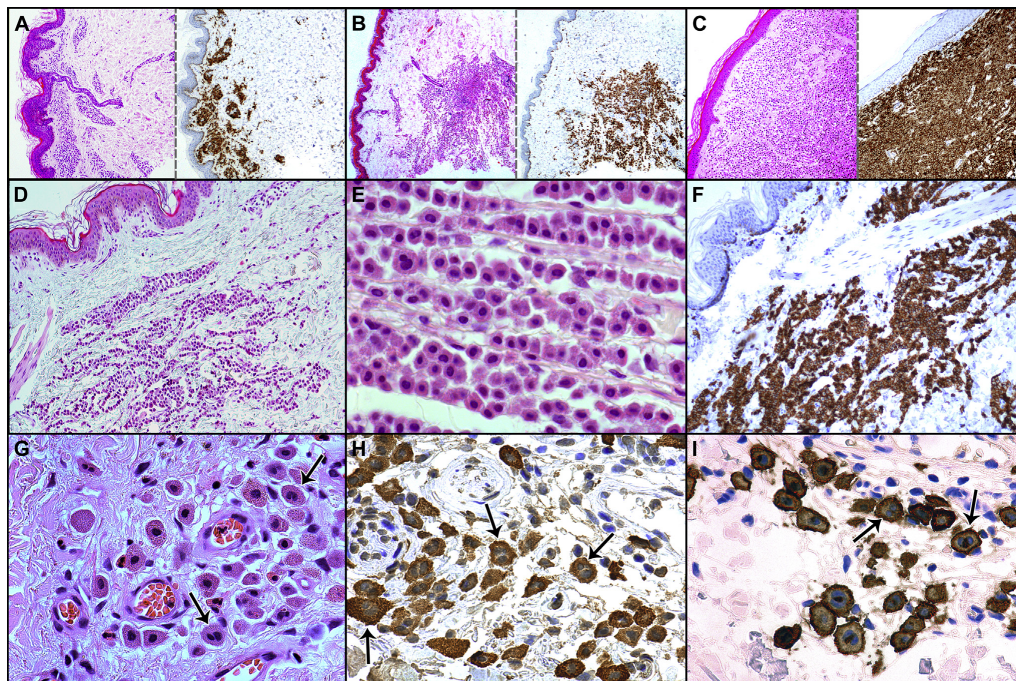


FIG 2. Representative histologic findings in skin lesion biopsy specimens from patients with WDSM. **A-C,** Skin biopsy specimens showing the 3 different histologic patterns of MC infiltration typically found in patients with WDSM (*left panels*, hematoxylin and eosin stain and $\times 40$ magnification; *right panels*, c-kit stain and $\times 40$ magnification): an interstitial/perivascular pattern characterized by dermal MC infiltrates within the interstitial spaces of the papillary dermis and surrounding the subepidermal vessels (Fig 1, A); a nodular pattern in which MCs are clustered with each other, forming large well-delimited dermal infiltrates accompanied by variable numbers of interstitial MCs (Fig 2, B); and a sheet-like pattern showing a diffuse MC infiltrate occupying the entire papillary and reticular dermis (Fig 2, C). **D-F,** Skin biopsy specimens showing round/polygonal skin MCs with the typical strand-like disposition (Fig 2, D, hematoxylin and eosin stain and $\times 100$ magnification; Fig 2, E, hematoxylin and eosin stain and $\times 600$ magnification; Fig 2, F, c-kit stain and $\times 100$ magnification). **G-I,** Skin biopsy specimens showing the round mature-like morphology of MCs and several bilobed promastocytes (arrows). The tryptase stain highlights the fully granulated cytoplasm of MCs. The c-kit stain shows a diffuse membranous and cytoplasmic dot-like pattern in MCs (Fig 2, G, hematoxylin and eosin stain and $\times 600$ magnification; Fig 2, H, tryptase stain and $\times 600$ magnification; Fig 2, I, c-kit stain and $\times 600$ magnification).

smears (Fig 3). In addition, hypergranulated promastocytes were identified in 3 (9%) patients, 2 of whom had a very high BM MC burden (Fig 3).

Immunophenotypically, BM MCs systematically lacked bright expression of both CD25 and CD2 (Fig 4); however, at least 1 of these markers was weakly expressed by 5% or more of the BM MCs in 7 (21%) patients (Table II). Compared with normal/reactive BM MCs, most patients exhibited underexpression of CD117 and FcεRI ($P < .001$), together with an abnormally increased light scatter (forward light scatter [FSC]/size and side light scatter [SSC]/granularity, $P < .001$) and overexpression of cytoplasmic carboxypeptidase A (CPA; $P = .03$, Table III and Fig 4). Aberrant expression of CD30, as assessed by means of flow cytometry (Fig 4) and immunohistochemistry, was found in 10 (71%) of 14 and 7 (50%) of 14 patients with WDSM tested, respectively.

KIT mutations were detected in only 10 (30%) of 33 patients, including the D816V ($n = 5$), I817V ($n = 1$), N819Y ($n = 1$), and K509I ($n = 3$) *KIT* mutations (Table II and see Table E1). Of note, those 3 patients with the K509I *KIT* mutation were members of the same family (2 sisters and their father), and they all had an associated gastrointestinal stromal tumor (GIST). In these 3 patients the K509I *KIT* mutation was detected in FACS-purified BM MCs, peripheral blood leukocytes, and, in the father, GIST cells, supporting a germline origin of the mutation. In turn, in the other *KIT*-mutated cases, the D816V, I817V, and N819Y *KIT* mutations were restricted to BM MCs.

sT levels

The median sT level at diagnosis was 9.3 $\mu\text{g/L}$ (range, 3.1-271 $\mu\text{g/L}$). Eight (24%) patients had sT levels of greater than 20 $\mu\text{g/L}$.

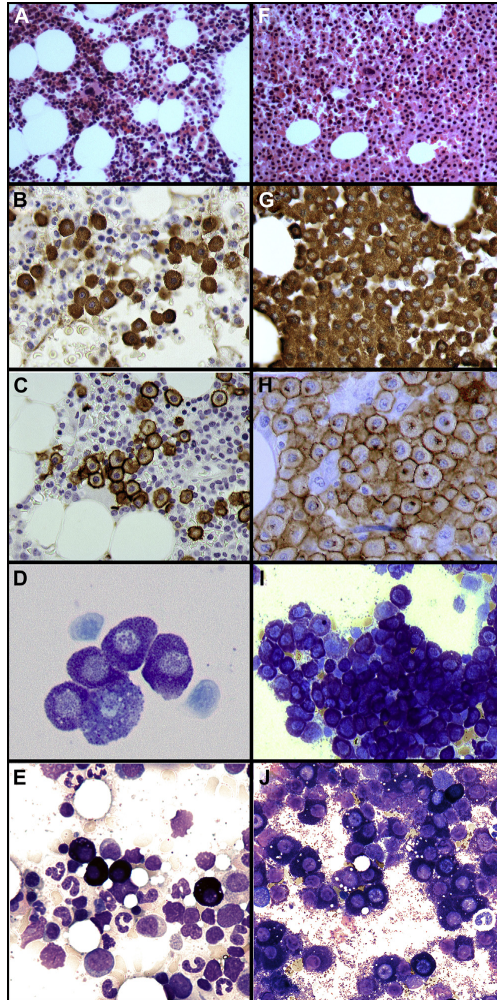


FIG 3. Images of representative histologic and cytomorphologic BM features in patients with WDSM. **A-E**, BM sections (Fig 3, A-C) and smears (Fig 3, D-E) showing small clusters of round mature-like MCs in a patient with mild BM MC infiltration (Fig 3, A, hematoxylin and eosin stain and $\times 200$ magnification; Fig 3, B, tryptase stain and $\times 600$ magnification; Fig 3, C, c-kit stain and $\times 600$ magnification; Fig 3, D, toluidine blue stain and $\times 1000$ magnification; Fig 3, E, May-Grünwald-Giemsa stain and $\times 600$ magnification). **F-J**, BM sections (Fig 3, F-H) and smears (Fig 3, I-J) showing a marked increase of round and well-granulated MCs diffusely infiltrating the BM in a patient fulfilling the criteria for MCL (Fig 3, F, hematoxylin and eosin stain and $\times 200$ magnification; Fig 3, G, tryptase stain and $\times 600$ magnification; Fig 3, H, c-kit stain and $\times 600$ magnification; Fig 3, I, toluidine blue stain and $\times 600$ magnification; Fig 3, J, May-Grünwald-Giemsa stain and $\times 600$ magnification).

whereas 19 (58%) patients had normal sT levels ($<11.4 \mu\text{g/L}$, Table II). Overall, sT levels showed a significant correlation with the percentage of BM MCs detected by means of flow cytometry

($R = 0.816$, $P < .001$), with the highest sT values corresponding to patients with high BM MC burden (Table II).

WHO 2008 criteria for SM

Despite most of the 33 patients having multiorgan (eg, systemic) involvement (eg, skin lesions plus BM aggregates), only 9 (27%) patients could be given a diagnosis of SM strictly based on the WHO 2008 criteria. These 9 patients had BM MC aggregates together with 1 ($n = 7$) or 2 ($n = 2$) minor criteria; according to the WHO 2008 classification of SM, 4 of these 9 patients corresponded to ISM, 1 to SSM, and 4 to MCL (Table II). The other 24 (73%) patients did not meet enough criteria for SM and were eventually classified as having CM according to the same WHO 2008 classification of mastocytosis, despite the presence of BM aggregates of 15 or more MCs in the absence of other minor criteria in 12 of this subgroup of 24 patients. Another 7 patients fulfilled 1 to 2 minor criteria in the absence of MC aggregates in the BM biopsy specimen, and 4 patients did not fulfil any of the major or minor criteria for SM (Table II). The pediatric patient who fulfilled only 1 minor criterion (sT level $>20 \mu\text{g/L}$) for SM was unclassifiable according to WHO recommendations because he underwent BM aspiration without biopsy, and thus the presence of compact MC aggregates in BM sections could not be evaluated, even though he showed BM MC aggregates in BM smears (Table II). Patients classified as having CM after the WHO 2008 classification had MPCM and normal sT levels ($<11.5 \mu\text{g/L}$) more frequently than those fulfilling the WHO 2008 criteria for SM (96% vs 56% [$P = .01$] and 75% vs 22% [$P = .009$], respectively); by contrast, no significant differences were observed regarding MC mediator release symptoms between both groups of patients.

Pattern of inactivation of chromosome X by using HUMARA in BM MCs

MC clonality was established by using HUMARA on highly purified BM MCs from 8 female patients who systematically lacked *KIT* mutations. These included 6 patients classified as having CM when the WHO 2008 diagnostic criteria were strictly applied, 1 patient with ISM, and 1 patient who fulfilled the criteria for MCL (Table II). By contrast, a polyclonal HUMARA pattern was detected in 6 patients, which included 3 patients with CM, 1 patient with SSM, and 2 patients with MCL; one of these latter 2 patients corresponded to a female subjects with the K509I (germline) *KIT* mutation (Table II).

DISCUSSION

Currently, it is well established that mutations involving codon 816 of *KIT*, abnormal morphology, and strong expression of CD25 ($\text{CD25}^{+ \text{bright}}$) can be detected in BM MCs from the great majority of patients with SM provided that highly sensitive diagnostic methods are used.^{6,9,21,22} Despite this, patients with MCs who lack such biological features have been sporadically reported in the literature. Thus in 2004, Akin et al⁴ reported a case of ASM associated with CD25^{-} BM MCs with a normal morphologic appearance and a germline mutation (F522C) involving the transmembrane domain of *KIT*. This unusual variant of mastocytosis was termed WDSM based on the mature morphology of MCs and their well-differentiated phenotype.

TABLE II. WHO criteria for SM and MC clonality assessment in patients with WDSM

Patient ID	Sex	MC aggregates in BM sections/smears	Well-differentiated MC morphology	CD25/CD2 expression (% of positive cells)	BM MCs by FC (%)	<i>KIT</i> mutation	sT (μg/L)	sT >20 μg/L	WHO criteria for SM	WHO diagnosis	HUMARA
1	F	Yes/Yes	Yes	—/—	0.02	No	11	No	1 major	CM	Polyclonal
2	M	Yes/No	Yes	—/—	0.009	No	7.9	No	1 major	CM	NA
3	F	Yes/Yes	Yes	—/—	0.1	No	6.5	No	1 major	CM	Not tested
4	F	Yes/Yes	Yes	—/—	0.077	No	7.3	No	1 major	CM	Clonal
5	F	Yes/No	Yes	—/—	1.05	D816V	11.5	No	1 major + 1 minor	SM (ISM)	Not tested
6	F	Yes/Yes	Yes	—/—	0.3	No	12.5	No	1 major	CM	Clonal
7	F	No*/Yes	Yes	—/—	0.0092	No	6.6	No	No	CM	Clonal
8	F	Yes/Yes	Yes	—/—	0.12	No	12.3	No	1 major	CM	Clonal
9	F	No*/No	Yes	—/—	0.008	D816V	3.2	No	1 minor	CM	Not tested
10	F	No/No	Yes	—/+low (10%)	0.001	D816V	3.1	No	2 minor	CM	Not tested
11	F	Yes/Yes	Yes	—/+low (100%)	14	No	244	Yes	1 major + 2 minor	SM (MCL)	Polyclonal
12	F	Yes/Yes	Yes	—/—	0.02	No	17.8	No	1 major	CM	Clonal
13	M	Yes/No	Yes	—/—	0.002	D816V	6.5	No	1 major + 1 minor	SM (ISM)	NA
14	F	Yes/Yes	Yes	—/—	0.013	N819Y	15	No	1 major	CM	Not tested
15	F	Yes/Yes	Yes	—/—	0.02	No	5.2	No	1 major	CM	Homozygous
16	F	Yes/Yes	Yes	—/+low (96%)	0.15	No	193	Yes	1 major + 2 minor	SM (SSM)	Polyclonal
17	F	No*/No	Yes	—/—	0.008	I817V	3.6	No	No	CM	Not tested
18	F	Yes/Yes	Yes	—/+low (27%)	0.028	No	4.5	No	1 major + 1 minor	SM (ISM)	Clonal
19	F	No*/Yes	Yes	—/—	0.034	D816V	8.2	No	1 minor	CM	Not tested
20	F	Yes/Yes	Yes	—/—	11.7	No	271	Yes	1 major + 1 minor	SM (MCL)	Clonal
21	F	Yes/Yes	Yes	—/—	0.015	No	6.5	No	1 major	CM	Clonal
22	F	Yes/Yes	Yes	—/—	0.04	No	18.2	No	1 major	CM	Not tested
23	M	Yes/Yes	Yes	—/—	7	K509I	84.9	Yes	1 major + 1 minor	SM (MCL)	NA
24	F	Yes/Yes	Yes	—/—	0.78	K509I	40.4	Yes	1 major + 1 minor	SM (ISM)	Not tested
25	F	Yes/Yes	Yes	—/—	11	K509I	108	Yes	1 major + 1 minor	SM (MCL)	Polyclonal
26	M	Yes/Yes	Yes	—/—	0.024	No	5.2	No	1 major	CM	NA
27	F	No*/Yes	Yes	—/—	0.018	No	5.7	No	No	CM	Polyclonal
28	F	No/Yes	Yes	+low (40%)/+low (40%)	0.01	No	6.2	No	1 minor	CM	Polyclonal
29	F	No*/Yes	Yes	+low (100%)/—	0.02	No	9.3	No	1 minor	CM	Not tested
30	F	No*/Yes	Yes	+low (100%)/—	0.016	No	6.0	No	1 minor	CM	Not tested
31	F	No*/Yes	Yes	—/—	0.04	No	11	No	No	CM	Not tested
32	M	No/Yes	Yes	—/—	0.3	No	37.5	Yes	1 minor	CM	NA
33	M	NA/Yes	Yes	—/—	0.2	No	121	Yes	1 minor	NA	NA
Total (%) F: 27 (82%) 21/27 (66%/82%) 33 (100%) 3/5 (9%/15%) 0.028 (0.001–14)‡ 10 (30%)† 9.3 (3.1–271)§ 8 (24%) 9/33§ (27%) 9/33§ (27%) 8/14 (57%)											

F, Female; FC, flow cytometry; M, male; NA, not available.

*Subdiagnostic aggregates of 2 to 14 MCs per cluster in BM sections.

†D816V in 5 (50%) of 10 mutated cases.

‡Expressed in medians (ranges).

§Number of patients fulfilling the WHO 2008 criteria for SM.

||Number of patients showing a clonal pattern of inactivation of chromosome X by using HUMARA from all female patients tested.

Since then, only a few studies have reported small numbers of patients with SM with similar morphologic and immunophenotypic patterns. Among such studies, the Spanish Network on Mastocytosis reported 9 patients classified as having WDSM who had a low frequency of exon 17 *KIT* mutations.⁶ In a later study including 2 additional patients (n = 11), we further showed that BM MCs from patients with WDSM frequently lacked CD25, CD2, or both, whereas they typically exhibited abnormally increased expression of cytoplasmic proteases versus other typical ISM cases⁸; more recently, BM MCs from 8 of 9 patients with WDSM were shown to aberrantly express CD30, a trait held in common with other cases of ISM and ASM.²³ In parallel, dramatic responses to imatinib therapy have been reported in the patient with the F522C *KIT* mutation,⁴ in another patient with WDSM who had no demonstrable *KIT* mutations,¹⁰ and,

more recently, in 3 patients with the K509I (germline) *KIT* mutation.^{11,12} Altogether, these observations support the notion that WDSM represents a subtype of SM that displays unique morphologic, phenotypic, and molecular features with potential therapeutic implications. Despite this, a precise description of the prevalence and clinical characteristics of WDSM, as well as a clear definition of the diagnostic criteria for this subtype of SM, are still lacking.

Here we describe the clinical, histopathologic, and molecular characteristics of a group of 33 patients with histologically proved MIS selected on the basis of an apparently normal morphology of MCs together with a CD25^{—/low} and CD2^{—/low} immunophenotype. Because all 33 patients had additional features that provided evidence for systemic involvement by mastocytosis, we conclude that they could be categorized as having WDSM, despite only a

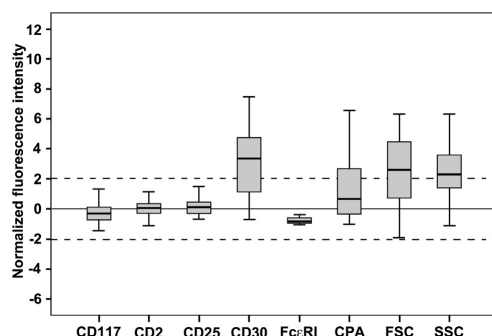


FIG 4. Flow cytometric immunophenotypic profile of BM MCs from patients with WDSM gated as CD117⁺high/CD45⁺ cells with intermediate to high scatter. *Solid and dotted horizontal lines represent the mean \pm 2 SDs (95% CI), respectively, of normalized fluorescence intensity values per BM MC for each immunophenotypic marker found in normal/reactive BM MCs from a group of patients without mastocytosis (n = 36) undergoing BM aspiration for reasons other than mastocytosis.*

minor fraction meeting the current WHO 2008 criteria for SM. Of note, combined use of the above 2 criteria allowed us to exclude patients with ISM with round hypergranulated MCs and strong CD25 expression,^{9,24} patients with myelomastocytic leukemia and acute MCL who had CD25⁺ MCs with an immature morphology,^{2,25} and patients in whom normal MCs coexist with a small population of morphologically abnormal CD25⁺bright MCs, as typically detected among patients with ISM with low tumor burden.^{8,9,26-28}

Despite CD25 and CD2 being systematically absent or expressed at low levels on the surface membrane, BM MCs from our patients could still be clearly distinguished from normal BM MCs based on their increased light scatter and abnormally high expression of CD30 and cytoplasmic CPA, as assessed by using flow cytometry, as previously suggested in small patient series.^{8,23} Of note, the light scatter properties and amount of cytoplasmic CPA cannot be evaluated by using immunohistochemistry; in addition, this latter technique also does not detect some CD30⁺ cases,²³ which supports an advantage for multiparameter flow cytometry versus conventional immunohistochemistry for an extended phenotypic analysis of BM MCs from patients with suspected WDSM. The greater amount of cytoplasmic proteases could help explain both the hypergranulated morphology of BM MCs in patients with WDSM and their abnormally increased forward FSC and SSC values versus normal BM MCs, as well as the lower than expected sT levels based on the extent of BM and skin involvement by MCs observed in our series (eg, 2 of 4 patients with MCL and 3 of 4 patients with ISM had sT levels <200 μ g/L and <20 μ g/L, respectively). Such findings probably reflect a reduced chronic release of tryptase per MC in patients with WDSM, which could be associated with the low frequency of the D816V *KIT* mutation, as discussed below. Another factor that might contribute to the unexpectedly low sT levels found among our patients with WDSM is the lower frequency of perivascular BM MC aggregates (vs typical SM),²⁹ which could make entrance of the tryptase released from these MCs into the systemic circulation more difficult.

TABLE III. Proposed diagnostic criteria for WDSM*

Major criterion
Compact MC aggregates in BM sections or smears
Minor criteria
Clustering of BM MCs outside BM particles forming groups of ≥ 2 MCs
Aberrant expression of CD30, overexpression of cytoplasmic proteases (CPA, tryptase, or both), or both by means of flow cytometry
Detection of mutations involving any codon of <i>KIT</i> or a clonal HUMARA pattern
Association of female sex with either pediatric disease onset or familial aggregation in adults

*At least the major plus 1 minor criterion or 3 minor criteria in the absence of the major criterion should be fulfilled.

Despite their apparently “normal” morphology, BM MCs from our patients also showed unique cytologic features, including a greater size than normal MCs, which is in line with their increased FSC on flow cytometric grounds, and a tendency to cluster with each other, forming small groups of a few MCs to focal MC aggregates, such as tryptase-positive round cell infiltrates in the BM,²⁴ which more rarely lead to a diffuse pattern of BM infiltration. Immunohistochemical staining of MCs for CD117 in the absence of both CD25 and CD34 (data not shown) contributed to the histologic differential diagnosis with other entities that might present with tryptase-positive round cell infiltrates in the BM, such as myelomastocytic leukemia, MCL, ISM, basophilic leukemia secondary to chronic myeloid leukemia, or CD117⁺ acute myeloid leukemia.^{24,30}

Among all biological features of pathologic MCs from our patients with WDSM, the unexpectedly low frequency of D816V *KIT* mutation and other exon 17 *KIT* mutations is probably the most relevant because it can render a significant proportion of patients sensitive to TKI therapy. In fact, complete responses to imatinib have been almost exclusively seen among D816V-negative patients with SM who carry other molecular alterations involving the transmembrane (eg, F522C) and juxtamembrane (eg, V560G and K509I) domains of *KIT*^{4,11,12,31-33} or no *KIT* mutation associated or not with mutations involving genes other than *KIT* (eg, FIP1L1/PDGFR α fusion gene).^{10,32,34} Fully in line with this, one third of our *KIT*-mutated patients with WDSM had the K509I mutation located at exon 9 in the extracellular juxtamembrane domain of *KIT*, which has been already reported in 4 patients with SM who were classified as having ASM, SSM evolving to ASM, MCL, and ISM, respectively,^{11,12,33} according to the WHO 2008 diagnostic criteria, and who had dramatic responses to imatinib. Interestingly, BM MCs from all 4 of these patients displayed a well-differentiated morphology, and CD25 levels were negative in 2 of 2 patients analyzed. Moreover, a complete response to imatinib has already been reported in one of the patients with WDSM included in our study who had clonal BM MCs with no *KIT* mutations (case 2)¹⁰ and in another 3 of 8 cases here analyzed included in the National Institutes of Health code NCT01297777 treatment protocol (data not shown).

Despite most patients (70%) from our study having wild-type *KIT*, MC clonality was established in a significant proportion of them through HUMARA, supporting the existence of as-yet-undiscovered mutations in genes other than *KIT* that could contribute to the clonal nature of the disease in a significant fraction of patients with WDSM. At the same time, we also

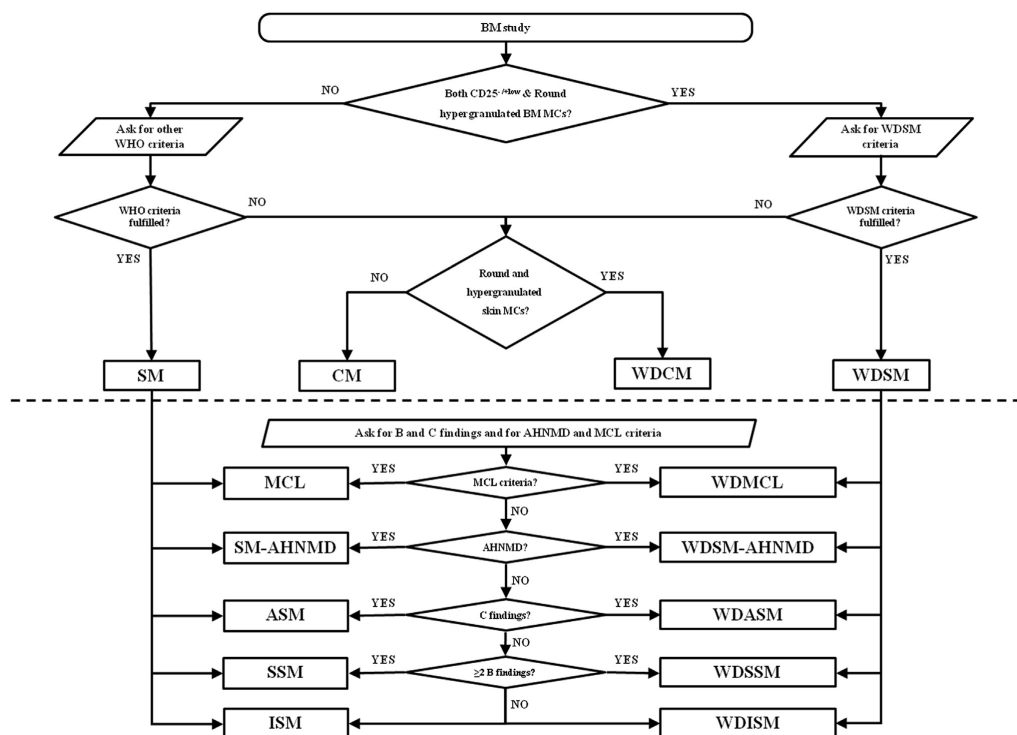


FIG 5. Proposed algorithm for the diagnosis and subclassification of patients with MIS and suspected BM involvement. After a BM study is performed, the first step is to determine the immunophenotypic expression of CD25 and morphologic appearance of BM MCs. If CD25 is strongly expressed by BM MCs (ie, CD25⁺⁺^{bright}) and/or they show an abnormal morphology (eg, spindle shape, eccentric and oval nucleus, hypogranulation, abnormal granule distribution, and granule fusion phenomena), the other WHO 2008 criteria are investigated. In patients in whom 1 major plus 1 minor criterion or at least 3 minor criteria are fulfilled, the diagnosis of (classical) SM is established, which is further subclassified on the investigation of B and C findings, other associated hematologic non-MC lineage disease, and the percentage of BM MCs. In turn, when evaluation of immunophenotypic and morphologic features of BM MCs reveals negative (or diminished) CD25 expression together with a round and hypergranulated (normal-like) appearance, respectively, WDSM is suspected, and the specific criteria here proposed should be applied (Table III). If 1 major plus 1 minor criterion for WDSM or at least 3 minor criteria for WDSM in the absence of BM MC aggregates are detected, the diagnosis of WDSM is confirmed even if the WHO 2008 criteria are not fulfilled. Then, following the same WHO recommendations for subclassification of classical SM, 5 subvariants of WDSM can be potentially identified, which will be termed by adding the descriptive appendix "WD" (well differentiated) to the final diagnosis, as previously suggested by others (ie, indolent WDSM [WDISM], aggressive WDSM [WDASM], and WDSM associated with another hematological non-MC lineage disease [WDSM-AHNMD], smoldering WDSM [WDSSM], and or MCL [WDMCL]).³⁷ In patients in whom neither the WHO criteria for SM nor the specific criteria here proposed for WDSM are detected but criteria for cutaneous involvement by mastocytosis are fulfilled, the diagnosis of either classical or well-differentiated CM (WDCM) is established according to the absence versus presence of dermal infiltrates by round and hypergranulated MCs, respectively.

show that a polyclonal HUMARA profile does not necessarily rule out the diagnosis of WDSM, as supported, for example, by the polyclonal XCIP detected in a patient carrying the germline K509I *KIT* mutation. It should be noted that multilineage involvement of hematopoiesis (and potentially also other tissues) has been associated with an increased risk for disease progression in D816V-positive patients with ISM.³⁵ In line with this hypothesis, half of our patients with WDSM who displayed a

polyclonal XCIP in their BM MCs corresponded to patients with a very high BM MC burden who were classified as having MCL ($n = 2$) and SSM ($n = 1$) per the WHO classification. In addition, all 3 familial cases with the K509I germline *KIT* mutation showed SM in association with GIST.

Despite the unique and common features described above, our patients with WDSM presented with a highly variable tumor burden. Thus although most patients had relatively low levels of

BM MC infiltration at the time of the BM study, approximately 15% of them had a markedly high BM MC burden, fulfilling the WHO 2008 criteria for either SSM or MCL. It is noteworthy that most of the latter patients with MCL had a slow and long-lasting disease course in the absence of WHO C-findings, fulfilling recently proposed criteria for chronic MCL.³⁶ The evidence for a prior long-term history of MIS in these patients, as well as in other patients with advanced WDSM reported in the literature,^{4,11,12,33} suggests that all of them had an indolent form of the disease at onset, which progressed over time. This provides a rationale for an early diagnostic work-up in patients with suspected WDSM and a close follow-up if WDSM is confirmed, particularly in patients in whom multilineal or germline *KIT* mutations are detected.

Although final evidence for WDSM is attained through morphologic, immunophenotypic, and molecular assessment of BM MCs, WDSM was already suspected in adult female patients with a pediatric onset of skin lesions in the context of a familial history of mastocytosis and maculopapular skin lesions, usually showing a central body distribution with frequent involvement of the neck by lesions with a (micro)nodular macroscopic appearance. Despite this, in our patients skin disease was heterogeneous, with patients also presenting with solitary or multiple (macro) nodular lesions or even DCM among those with the K509I *KIT* mutation, as also described by others.^{11,12,33} Despite the heterogeneity of cutaneous involvement, the unique mature appearance of MCs could also be systematically demonstrated in the skin of patients with WDSM; there MCs were frequently found in association with variable numbers of promastocytes and to form strands between collagen bundles, features that are rarely observed in other patients with mastocytosis. Further studies in which such features are investigated in skin lesions of children with MIS are needed to determine their potential predictive value for the persistence of mastocytosis into adulthood and its further potential correlation with underlying WDSM, particularly among female patients and those with a familial background of mastocytosis.

The hypothesis that WDSM can already emerge in childhood as a systemic disease in nature that persists into adulthood is supported by the fact that 2 of our patients had already received diagnoses of WDSM at young ages (2 and 12 years, respectively).

In turn, our study also confirms previous observations about spontaneous regression of skin involvement in some patients with WDSM before demonstration of the clonal nature of the disease in the BM,⁴ which would support a long-term follow-up of those children with a prior history of MIS and skin biopsy features suggesting WDSM, even after skin lesions eventually disappear. Finally, appropriate identification of patients with WDSM might also be of clinical relevance for genetic counseling purposes, given the high rate of familial cases described here.

Because current WHO criteria for SM only allow establishment of the systemic nature of the disease in a fraction of all patients with WDSM, additional diagnostic criteria for SM are needed for those patients presenting with MIS in association with BM infiltration by mature-appearing MCs (usually forming compact BM MC aggregates of >15 MCs per cluster) in the absence of bright CD25 expression by means of flow cytometry. Based on our results, specific minor diagnostic criteria for WDSM could be selected from those features found to be typically associated with the patients with WDSM described here. These include (1) adult women with a pediatric onset or familial aggregation in

first-degree relatives, (2) clustering of BM MCs outside BM particles forming pairs or triplets of MCs, (3) aberrant expression by BM MCs of CD30 together with overexpression of cytoplasmic proteases (CPA and trypsin) by using flow cytometry, and (4) mutations involving any codon of the *KIT* gene (or a clonal pattern of inactivation of the chromosome X by using HUMARA). Once combined with the presence of MC aggregates in either BM sections or BM smears, these criteria would have allowed correct diagnosis of all patients with WDSM studied here if the same scoring recommendations as those proposed by the WHO for classical SM (eg, presence of BM MC aggregates and 1 minor criterion or coexistence of at least 3 of 4 minor criteria here proposed in the absence of BM MC aggregates) had been followed (Table III). Following these newly proposed diagnostic criteria for WDSM and the WHO recommendations for the subclassification of SM, patients with WDSM could then be potentially subclassified into indolent WDSM, aggressive WDSM (WDASM), and WDSM associated with another hematological non-MC lineage disease (WDSM-AHNMD), smoldering WDSM (WDSM), or MCL (WDMCL; Fig 5) categories.³⁷

In summary, we show that despite WDSM constituting a biologically distinct rare subgroup of SM that can be misdiagnosed often as CM strictly based on the current WHO 2008 diagnostic criteria for SM, it is still highly heterogeneous both on clinical and molecular grounds. On clinical grounds, WDSM appears to show the entire clinical spectrum of typical CD25⁺ and D816V-positive SM, as supported by the existence of indolent, smoldering, aggressive, and leukemic WDSM cases. In turn, from a practical point of view, identification of the molecular subgroups of WDSM as defined by the presence versus absence of exon 17 *KIT* mutations appears to be of utmost relevance because of the higher probability of response to TKI therapy of patients carrying *KIT* mutations at exons other than exon 17 reported in the literature. Because WDSM only accounts for a very small fraction of all cases of SM (approximately 5%), multicenter studies including larger series of patients are needed to confirm our findings, to define and validate the new diagnostic criteria here proposed and the current WHO criteria for subclassification of this rare subgroup of patients with SM, and to establish prospective clinical trials to evaluate the effects of TKI therapy in the above-defined molecular subgroups of patients with WDSM.

Clinical implications: WDSM represents a rare subtype of SM with unique clinical, biological, and molecular features that requires specific diagnostic criteria for systemic involvement and will potentially benefit from *KIT* tyrosine kinase–targeted therapy.

REFERENCES

1. Horny HP, Metcalfe DD, Bennet JM, Bain BJ, Akin C, Escribano L, et al. Mastocytosis. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, editors. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: IARC; 2008. pp. 54-63.
2. Valent P, Akin C, Escribano L, Fodinger M, Hartmann K, Brockow K, et al. Standards and standardization in mastocytosis: consensus statements on diagnostics, treatment recommendations and response criteria. *Eur J Clin Invest* 2007;37:435-53.
3. Valent P, Escribano L, Broesby-Olsen S, Hartmann K, Grattan C, Brockow K, et al. Proposed diagnostic algorithm for patients with suspected mastocytosis: a proposal of the European Competence Network on Mastocytosis. *Allergy* 2014;69:1267-74.

4. Akin C, Fumo G, Yavuz AS, Lipsky PE, Neckers L, Metcalfe DD. A novel form of mastocytosis associated with a transmembrane c-kit mutation and response to imatinib. *Blood* 2004;103:3222-5.
5. Akin C, Escribano L, Núñez R, García-Montero A, Angulo M, Orfao A, et al. Well-differentiated systemic mastocytosis: a new disease variant with mature mast cell phenotype and lack of codon 816 c-Kit mutations. *J Allergy Clin Immunol* 2004;113(suppl):S327.
6. García-Montero AC, Jara-Acevedo M, Teodosio C, Sanchez ML, Nunez R, Prados A, et al. KIT mutation in mast cells and other bone marrow haematopoietic cell lineages in systemic mast cell disorders. A prospective study of the Spanish Network on Mastocytosis (REMA) in a series of 113 patients. *Blood* 2006;108:2366-72.
7. Jara-Acevedo M, García-Montero A, Teodosio C, Escribano L, Alvarez-Twose I, Sanchez-Munoz L, et al. Well-differentiated systemic mastocytosis (WDSM): a novel form of mastocytosis. *Haematologica* 2008;93:91.
8. Teodosio C, García-Montero AC, Jara-Acevedo M, Sanchez-Munoz L, Alvarez-Twose I, Nunez R, et al. Mast cells from different molecular and prognostic subtypes of systemic mastocytosis display distinct immunophenotypes. *J Allergy Clin Immunol* 2010;125:719-26.
9. Sanchez-Munoz L, Alvarez-Twose I, García-Montero AC, Teodosio C, Jara-Acevedo M, Pedreira CE, et al. Evaluation of the WHO criteria for the classification of patients with mastocytosis. *Mod Pathol* 2011;24:1157-68.
10. Alvarez-Twose I, Gonzalez P, Morgado JM, Jara-Acevedo M, Sanchez-Munoz L, Matito A, et al. Complete response after imatinib mesylate therapy in a patient with well-differentiated systemic mastocytosis. *J Clin Oncol* 2012;30:e126-9.
11. Chan EC, Bai Y, Kirshenbaum AS, Fischer ER, Simakova O, Bandara G, et al. Mastocytosis associated with a rare germline KIT K509L mutation displays a well-differentiated mast cell phenotype1. *J Allergy Clin Immunol* 2014;134:178-87.
12. de Melo CP, Machado-Neto JA, Scopim-Ribeiro R, Visconte V, Tabarrok A, Duarte AS, et al. Familial systemic mastocytosis with germline KIT K509L mutation is sensitive to treatment with imatinib, dasatinib and PKC412. *Leuk Res* 2014;38:1245-51.
13. Kopp P, Jaggi R, Tobler A, Borisch B, Oestreich M, Sabacan L, et al. Clonal X-inactivation analysis of human tumours using the human androgen receptor gene (HUMARA) polymorphism: a non-radioactive and semiquantitative strategy applicable to fresh and archival tissue. *Mol Cell Probes* 1997;11:217-28.
14. Wu Y, Basir Z, Kajdacsy-Balla A, Strawn E, Macias V, Montgomery K, et al. Resolution of clonal origins for endometriotic lesions using laser capture microdissection and the human androgen receptor (HUMARA) assay. *Fertil Steril* 2003;79:710-7.
15. Hartmann K, Henz BM. Classification of cutaneous mastocytosis: a modified consensus proposal. *Leuk Res* 2002;26:483-4.
16. Escribano L, Diaz-Agustin B, López A, López RN, García-Montero A, Almeida J, et al. Immunophenotypic analysis of mast cells in mastocytosis: when and how to do it. Proposals of the Spanish network on mastocytosis (REMA). *Cytometry B Clin Cytom* 2004;58B:1-8.
17. Sanchez-Munoz L, Teodosio C, Morgado JM, Escribano L. Immunophenotypic characterization of bone marrow mast cells in mastocytosis and other mast cell disorders. *Methods Cell Biol* 2011;103:333-59.
18. Alvarez-Twose I, Morgado JM, Sanchez-Munoz L, García-Montero A, Mollejo M, Orfao A, et al. Current state of biology and diagnosis of clonal mast cell diseases in adults. *Int J Lab Hematol* 2012;34:445-60.
19. Escribano L, García-Montero A, Sanchez-Munoz L, Teodosio C, Alvarez-Twose I, Jara-Acevedo M, et al. Diagnosis of adult mastocytosis: role for bone marrow analysis. In: Kottke-Marchant K, Davis B, editors. *Laboratory hematology practice*. London: Wiley-Blackwell; 2012. pp. 388-98.
20. Sotlar K, Escribano L, Landt O, Möhrle S, Herrero S, Torrel A, et al. One-step detection of c-kit point mutations using PNA-mediated PCR-clamping and hybridization probes. *Am J Pathol* 2003;162:737-46.
21. Morgado JM, Sanchez-Munoz L, Teodosio CG, Jara-Acevedo M, Alvarez-Twose I, Matito A, et al. Immunophenotyping in systemic mastocytosis diagnosis: 'CD25 positive' alone is more informative than the 'CD25 and/or CD2' WHO criterion. *Mod Pathol* 2012;25:516-21.
22. Kristensen T, Vestergaard H, Moller MB. Improved detection of the KIT D816V mutation in patients with systemic mastocytosis using a quantitative and highly sensitive real-time qPCR assay. *J Mol Diagn* 2011;13:180-8.
23. Morgado JM, Perbellini O, Johnson RC, Teodosio C, Matito A, Alvarez-Twose I, et al. CD30 expression by bone marrow mast cells from different diagnostic variants of systemic mastocytosis. *Histopathology* 2013;63:780-7.
24. Horny HP, Sotlar K, Stellmacher F, Krokowski M, Agis H, Schwartz LB, et al. The tryptase positive compact round cell infiltrate of the bone marrow (TROCI-BM): a novel histopathological finding requiring the application of lineage specific markers. *J Clin Pathol* 2006;59:298-302.
25. Valent P, Akin C, Arock M, Brockow K, Butterfield JH, Carter MC, et al. Definitions, criteria and global classification of mast cell disorders with special reference to mast cell activation syndromes: a consensus proposal. *Int Arch Allergy Immunol* 2011;157:215-25.
26. Alvarez-Twose I, Gonzalez de Olano D, Sanchez-Munoz L, Matito A, Esteban-Lopez MI, Vega A, et al. Clinical, biological and molecular characteristics of systemic mast cell disorders presenting with severe mediator-related symptoms. *J Allergy Clin Immunol* 2010;125:1269-78.
27. Teodosio C, García-Montero AC, Jara-Acevedo M, Alvarez-Twose I, Sanchez-Munoz L, Almeida J, et al. An immature immunophenotype of bone marrow mast cells predicts for multilineage D816V KIT mutation in systemic mastocytosis. *Leukemia* 2012;26:951-8.
28. Alvarez-Twose I, Zanotti R, Gonzalez-de-Olano D, Bonadonna P, Vega A, Matito A, et al. Nonaggressive systemic mastocytosis (SM) without skin lesions associated with insect-induced anaphylaxis shows unique features versus other indolent SM. *J Allergy Clin Immunol* 2014;133:520-8.
29. Parker RI. Hematologic aspects of mastocytosis: I: bone marrow pathology in adult and pediatric systemic mast cell disease. *J Invest Dermatol* 1991;96(suppl):47S-51S.
30. Valent P, Sperr WR, Samorapoompichit P, Geissler K, Lechner K, Horny HP, et al. Myelomastocytic overlap syndromes: biology, criteria, and relationship to mastocytosis. *Leuk Res* 2001;25:595-602.
31. Frost MJ, Ferrao PT, Hughes TP, Ashman LK. Juxtamembrane mutant V560GKit is more sensitive to Imatinib (STI571) compared with wild-type c-kit whereas the kinase domain mutant D816VKit is resistant. *Mol Cancer Ther* 2002;1:1115-24.
32. Akin C, Brockow K, D'Ambrosio C, Kirshenbaum AS, Ma YS, Longley BJ, et al. Effects of tyrosine kinase inhibitor STI571 on human mast cells bearing wild-type or mutated c-kit. *Exp Hematol* 2003;31:686-92.
33. Zhang LY, Smith ML, Schultheis B, Fitzgibbon J, Lister TA, Melo JV, et al. A novel K509L mutation of KIT identified in familial mastocytosis—in vitro and in vivo responsiveness to imatinib therapy. *Leuk Res* 2006;30:373-8.
34. Pardanani A, Elliott M, Reeder T, Li CY, Baxter EJ, Cross NCP, et al. Imatinib for systemic mast-cell disease. *Lancet* 2003;362:535-7.
35. Escribano L, Alvarez-Twose I, Sanchez-Munoz L, García-Montero A, Nunez R, Almeida J, et al. Prognosis in adult indolent systemic mastocytosis: a long-term study of the Spanish Network on Mastocytosis in a series of 145 patients. *J Allergy Clin Immunol* 2009;124:514-21.
36. Valent P, Sotlar K, Sperr WR, Escribano L, Yavuz S, Reiter A, et al. Refined diagnostic criteria and classification of mast cell leukemia (MCL) and myelomastocytic leukemia (MML): a consensus proposal. *Ann Oncol* 2014;25:1691-700.
37. Akin C, Valent P. Diagnostic criteria and classification of mastocytosis in 2014. *Immunol Allergy Clin North Am* 2014;34:207-18.

TABLE E1. *KIT* mutation analysis performed in patients with WDSM

Patient ID	<i>KIT</i> mutation	<i>KIT</i> exons investigated (sequenced)
1	No	2, 8, 9, 10, 11, 17
2	No	2, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 17
3	No	10, 11, 17
4	No	2, 8, 9, 10, 11, 17
5	D816V	17
6	No	2, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 17
7	No	2, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 17
8	No	2, 9, 10, 11, 17
9	D816V	17
10	D816V	17
11	No	2, 8, 9, 10, 11, 17
12	No	2, 9, 10, 11, 17
13	D816V	17
14	N819Y	17
15	No	8, 9, 10, 11, 17
16	No	2, 9, 10, 11, 17
17	I817V	17
18	No	8, 9, 10, 11, 17
19	D816V	17
20	No	2, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 17
21	No	2, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 17
22	No	2, 9, 10, 11, 17
23	K509I	9, 17
24	K509I	9, 17
25	K509I	9, 17
26	No	8, 9, 10, 11, 17
27	No	2, 8, 9, 10, 11, 17
28	No	2, 9, 11, 17
29	No	8, 11, 17
30	No	2, 8, 9, 10, 11, 17
31	No	2, 8, 9, 10, 11, 17
32	No	2, 9, 10, 11, 14, 15, 17
33	No	2, 9, 11, 17

3.3.2. COMPLETE RESPONSE AFTER IMATINIB MESYLATE THERAPY IN A PATIENT WITH WELL-DIFFERENTIATED SYSTEMIC MASTOCYTOSIS.

Iván Álvarez-Twose, Pablo González, José Mário Morgado, María Jara-Acevedo, Laura Sánchez-Muñoz, Almudena Matito, Manuela Mollejo, Alberto Orfao y Luis Escribano.

J Clin Oncol 2012;30(12):e126-129.

Complete Response After Imatinib Mesylate Therapy in a Patient With Well-Differentiated Systemic Mastocytosis

Somatic activating D816V *KIT* mutation plays a critical role in the pathogenesis of most systemic mastocytosis (SM) cases. As a result of ligand-independent phosphorylation of the mutated tyrosine kinase (TK) *KIT* receptor, constitutive activation of mast cells (MCs) and their accumulation in different tissues occurs.¹ Apart from its value in the diagnostic work-up of mastocytosis, detection of D816V *KIT* mutation has therapeutic implications, because its presence renders neoplastic MCs resistant to imatinib;²⁻⁶ in addition, other imatinib-resistant *KIT* mutations have been reported in SM, such as the N822I mis-sense mutation⁷ and the Val559Ile juxtamembrane-type mutation,⁸ among others. In contrast, imatinib might be useful in patients with SM who lack *KIT* mutations^{2,6,9} or carry mutations located outside the activation loop (exon 17) of *KIT*, such as the Phe522Cys mutation at the transmembrane portion of *KIT*,¹⁰ the K509I mutation in exon 9,¹¹ and deletions of codon 419 in exon 8 (c.1255-1257delGAC).¹²

Well-differentiated SM (WDSM) is a rare variant of SM characterized by compact bone marrow (BM) infiltrates composed of mature, round-shaped, fully granulated MC lacking CD25 and CD2 expression and the D816V *KIT* mutation.^{10,13-15} To date, there has been only one report of a patient with WDSM who carried the Phe522Cys *KIT* mutation and was successfully treated with imatinib.¹⁰ After therapy, dramatic improvement in clinical symptoms together with a marked decrease in BM MC infiltration was achieved; although a potential beneficial effect of imatinib on mastocytosis skin lesions from WDSM patients could also be expected, given the absence of cutaneous involvement in this patient, such benefit remains unknown.

Here we report a complete cutaneous and BM response to imatinib in a young adult patient diagnosed with WDSM in the absence of *KIT* mutations who was treated because of a huge psychosocial impact of extensive cutaneous involvement.

Case Report

A 25-year-old man presented at the Instituto de Estudios de Mastocitosis de Castilla La Mancha for evaluation of SM. He had a history of multiple small reddish-brown macules and micronodules involving the trunk, neck and proximal extremities (Fig 1, panel A); skin lesions showed a positive Darier's sign and emerged when he was 3 months of age. A skin biopsy revealed a dense sheet-like infiltrate of round and polygonal MC filling the dermis (Fig 2, panel A: hematoxylin and eosin stain $\times 10$ magnification; panel C: c-kit stain $\times 10$ magnification). Clinically, the patient suffered from itching, urtication of skin lesions and flushing triggered by warm water, heat and stress; furthermore, he had had an anaphylactic reaction secondary to dihydroergotamine mesylate several years before. Physical examination, except for

the presence of mastocytosis skin lesions and multiple atypical melanocytic nevi, was unremarkable. BM studies showed compact aggregates of c-kit-positive and tryptase-positive, CD25-negative, round-shaped, and fully granulated MCs. Flow cytometry immunophenotyping showed a mature MC phenotype with abnormally increased light scatter, absence of CD25 and CD2 expression, and increased amount of cytoplasmic tryptase content, in line with previously described features of WDSM.^{14,15} Molecular analysis of purified BM MCs, following previously described methods,¹⁶ did not reveal *KIT* mutations in exons 10, 11, and 17. The baseline serum tryptase level was of 9.4 $\mu\text{g/L}$ (normal range: 5.5-13.5 $\mu\text{g/L}$), and both peripheral-blood cell counts and serum biochemistry parameters were also within the normal limits. According to recently proposed modifications of diagnostic criteria,¹⁵ altogether these findings were consistent with the diagnosis of WDSM.

Despite the indolent course of the disease, the patient felt stigmatized because of his skin appearance, resulting in reduced self-esteem, depressed mood, social isolation and suicidal thoughts. Psychiatric evaluation confirmed a profoundly negative psychosocial impact of the disease on the patient's quality of life; for this reason, given the lack of demonstrable *KIT* catalytic domain mutations, compassionate treatment with imatinib mesylate was started, after written informed consent was given by the patient. Imatinib was initially administered at a dose of 100 mg/day orally, increased to 200 mg/day on day 10 and to 300 mg/day from the 6th month of therapy onward. Therapy was well tolerated, and all clinical symptoms completely resolved within 2 months. Improvement of skin lesions were first noticed after 8 months of therapy, and the response was complete beyond 1 year. Figure 1B shows the total regression of skin lesions 18 months after initiating imatinib, with persistence of melanocytic nevi. At that time, a striking decrease of dermal MC infiltrates (Fig 2, panel B: hematoxylin and eosin stain $\times 10$ magnification; panel D: tryptase stain $\times 10$ magnification) and only few loosely scattered BM MCs were observed in skin and BM biopsies, respectively; in addition, serum tryptase levels decreased to 2.9 $\mu\text{g/L}$. Noteworthy, improvement of skin lesions resulted in a parallel improved mood, emotional state, and quality of life. In view of the overall response, imatinib was discontinued 18 months after initiating therapy. Currently, the patient remains in remission of his skin lesions 8 months after therapy discontinuation.

Discussion

Over the last decades, imatinib mesylate has emerged as one of the most active therapies in several malignancies, such as chronic myeloid leukemia, hypereosinophilic syndrome and gastrointestinal stromal tumors, on the basis of its ability to inhibit the mutated TK *ABL*,^{17,18} *PDGFR*,¹⁹⁻²³ and *KIT*,^{24,25} respectively. Although most patients with mastocytosis carry *KIT* mutations, both in vitro and ex vivo studies have shown that the inhibitory effect of imatinib depends on the specific localization of the mutation within the *KIT* sequence. Therefore, mutations involving the *KIT* activation loop (eg, D816V) induce conformational changes in the enzymatic domain of the protein that

Diagnosis in Oncology



Fig 1.

prevent binding of imatinib and render mutated MCs resistant to the TK inhibition^{3,26,27}; by contrast, mutations occurring outside exon 17 of *KIT*, except in rare cases, have proved to be sensitive to imatinib in vitro.^{3,10,11,28,29} Accordingly, despite the heterogeneity of inclusion criteria in clinical studies using imatinib in patients with SM, the majority of those patients who lack the D816V *KIT* mutation seem to show significant responses.^{2,5,6,10,11,30} However, the true effect of imatinib on mastocytosis skin lesions from responsive patients is obscured by the fact that cutaneous involvement is either absent or not clearly specified in most case reports or series of patients, respectively. In fact,

as far as we know, there are only three well-documented mastocytosis cases reported in the literature in which the cutaneous status before and after imatinib therapy is illustrated with photographs, as recently recommended to allow third-party confirmation of response.³¹ These cases included a 23-month-old boy diagnosed with cutaneous mastocytosis (CM) carrying an exon 8 *KIT* mutation resulting in deletion of codon 419,¹² and two adult patients with SM negative for the D816V *KIT* mutation: a 46-year-old man with indolent SM and a 57-year-old woman with aggressive SM.^{2,32} Notably, although these three patients experienced symptomatic and biologic improvement of the disease

Álvarez-Twose et al

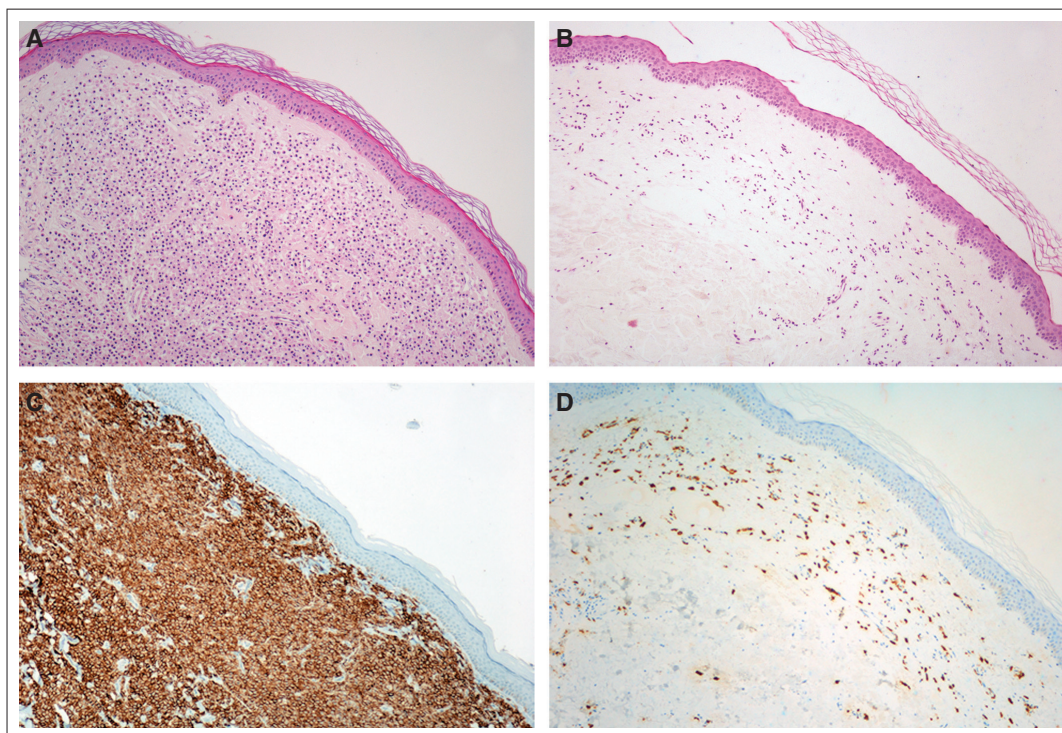


Fig 2.

with imatinib, including an histological BM remission in the patient with indolent SM, none of them showed complete regression of their skin lesions (see referenced articles for details).

Here, we report a complete cutaneous and BM response after imatinib therapy in a patient with WDSM lacking *KIT* mutations. WDSM was first described by Akin et al¹⁰ in a young adult female patient who presented with bulky splenomegaly, pancytopenia, and markedly elevated serum tryptase levels, whose BM was found to be massively infiltrated by round, highly granulated MCs carrying a germline transmembrane *KIT* mutation. The disease was refractory to interferon but responded to treatment with imatinib. Interestingly, the patient had a history of pediatric CM that resolved by the adolescence; for this reason, a potential cutaneous response after imatinib could not be assessed. It should be emphasized that most patients with nonaggressive forms of mastocytosis have a normal life expectancy^{33,34} and thus are not suitable candidates for novel therapies, such as imatinib, with undetermined long-term adverse effects. By contrast, imatinib is indicated in cases of aggressive or clearly progressing SM in which mutations involving the activation loop of *KIT* are not detected. In our patient, the decision to start imatinib therapy was prompted by the huge psychological impact of the skin appearance after a careful psychiatric evaluation. Interestingly, unlike the relatively early improvement of MC-mediator release symptoms, a late cutaneous response was observed, supporting the notion that imatinib does not

have a direct cytotoxic effect on MCs. A possible explanation for this late response could be that the imatinib-mediated inhibition of continuously activated *KIT* has an “immortalizing” effect on MC, which will then remain in the tissue as long as their already normalized life span allows. In line with this, previous observations indicate that connective tissue MCs have an extremely long life span,³⁵ suggesting that imatinib should be given for a long period of time in order to obtain a significant cutaneous response in patients with mastocytosis.

In conclusion, the case reported here provides the first well-documented evidence of a complete cutaneous response to imatinib in SM. Furthermore, the disappearance of skin lesions resulted in the complete remission of a secondary psychological disorder, which translated into an improvement of the patient’s quality of life. It should be emphasized that imatinib should be recommended only in cases of SM without exon 17 *KIT* mutations in progression or with an overtly aggressive course. Rarely, this therapy could also be considered in adult patients with an indolent disease and severe psychological impact because of extensive skin involvement.

Iván Álvarez-Twose

Instituto de Estudios de Mastocitosis de Castilla La Mancha, Hospital Virgen del Valle, Toledo, Spain

Pablo González

Hospital Virgen de las Nieves, Granada, Spain

Diagnosis in Oncology

José Mário Morgado

Instituto de Estudios de Mastocitosis de Castilla La Mancha, Hospital Virgen del Valle, Toledo, Spain

María Jara-Acevedo

Centro de Investigación del Cáncer, Universidad de Salamanca, Salamanca, Spain

Laura Sánchez-Muñoz and Almudena Matito

Instituto de Estudios de Mastocitosis de Castilla La Mancha, Hospital Virgen del Valle, Toledo, Spain

Manuela Mollejo

Hospital Virgen del Valle, Toledo, Spain

Alberto Orfao

Centro de Investigación del Cáncer, Universidad de Salamanca, Salamanca, Spain

Luis Escribano

Instituto de Estudios de Mastocitosis de Castilla La Mancha, Hospital Virgen del Valle, Toledo, Spain

ACKNOWLEDGMENT

Supported by grants from the Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS) of the Ministerio de Ciencia e Innovación of Spain (PS09/00032), and by Junta de Comunidades de Castilla La Mancha (FISCAM 2007/36, Fundación Sociosanitaria de Castilla-La Mancha 2010/008 y G-2010/C-002).

AUTHORS' DISCLOSURES OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST

The author(s) indicated no potential conflicts of interest.

REFERENCES

- Longley BJ, Reguera MJ, Ma Y: Classes of c-KIT activating mutations: Proposed mechanisms of action and implications for disease classification and therapy. *Leuk Res* 25:571-576, 2001
- Pardanani A, Elliott M, Reeder T, et al: Imatinib for systemic mast-cell disease. *Lancet* 362:535-537, 2003
- Akin C, Brockow K, D'Ambrosio C, et al: Effects of tyrosine kinase inhibitor STI571 on human mast cells bearing wild-type or mutated c-kit. *Exp Hematol* 31:686-692, 2003
- Droogendijk HJ, Kluin-Nelemans HJ, Van Doormaal JJ, et al: Imatinib mesylate in the treatment of systemic mastocytosis: A phase II trial. *Cancer* 107:345-351, 2006
- Pagano L, Valentini CG, Caira M, et al: Advanced mast cell disease: An Italian Hematological Multicenter experience. *Int J Hematol* 88:483-488, 2008
- Vega-Ruiz A, Cortes JE, Sever M, et al: Phase II study of imatinib mesylate as therapy for patients with systemic mastocytosis. *Leuk Res* 33:1481-1484, 2009
- Wasag B, Niedoszytko M, Piskorz A, et al: Novel, activating KIT-N822I mutation in familial cutaneous mastocytosis. *Exp Hematol* 39:859-865, 2011
- Nakagomi N, Hirota S: Juxtamembrane-type c-kit gene mutation found in aggressive systemic mastocytosis induces imatinib-resistant constitutive KIT activation. *Lab Invest* 87:365-371, 2007
- Pardanani A, Ketterling RP, Brockman SR, et al: *CHIC2* deletion, a surrogate for *FIP1L1-PDGFR* fusion, occurs in systemic mastocytosis associated with eosinophilia and predicts response to imatinib mesylate therapy. *Blood* 102:3093-3096, 2003
- Akin C, Fumo G, Yavuz AS, et al: A novel form of mastocytosis associated with a transmembrane c-kit mutation and response to imatinib. *Blood* 103:3222-3225, 2004
- Zhang LY, Smith ML, Schultheis B, et al: A novel K509I mutation of *KIT* identified in familial mastocytosis - in vitro and in vivo responsiveness to imatinib therapy. *Leuk Res* 30:373-378, 2006
- Hoffmann KM, Moser A, Lohse P, et al: Successful treatment of progressive cutaneous mastocytosis with imatinib in a 2-year-old boy carrying a somatic KIT mutation. *Blood* 112:1655-1657, 2008
- Akin C, Escribano L, Núñez R, et al: Well-differentiated systemic mastocytosis: A new disease variant with mature mast cell phenotype and lack of codon 816 c-kit mutations. *J Allergy Clin Immunol* 113:S327, 2004
- Teodosio C, García-Montero AC, Jara-Acevedo M, et al: Mast cells from different molecular and prognostic subtypes of systemic mastocytosis display distinct immunophenotypes. *J Allergy Clin Immunol* 125:719-726, 2010
- Sánchez-Munoz L, Álvarez-Twose I, García-Montero AC, et al: Evaluation of the WHO criteria for the classification of patients with mastocytosis. *Mod Pathol* 24:1157-1168, 2011
- García-Montero AC, Jara-Acevedo M, Teodosio C, et al: KIT mutation in mast cells and other bone marrow haematopoietic cell lineages in systemic mast cell disorders. A prospective study of the Spanish Network on Mastocytosis (REMA) in a series of 113 patients. *Blood* 108:2366-2372, 2006
- Druker BJ, Savvyers CL, Kantarjian H, et al: Activity of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome. *N Engl J Med* 344:1038-1042, 2001
- Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, et al: Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 344:1031-1037, 2001
- Schaller JL, Burkland GA: Case report: Rapid and complete control of idiopathic hypereosinophilia with imatinib mesylate. *MedGenMed* 3:9, 2001
- Ault P, Cortes J, Koller C, et al: Response of idiopathic hypereosinophilic syndrome to treatment with imatinib mesylate. *Leuk Res* 26:881-884, 2002
- Cortes J, Ault P, Koller C, et al: Efficacy of imatinib mesylate in the treatment of idiopathic hypereosinophilic syndrome. *Blood* 101:4714-4716, 2003
- Klion AD, Noel P, Akin C, et al: Elevated serum tryptase levels identify a subset of patients with a myeloproliferative variant of idiopathic hypereosinophilic syndrome associated with tissue fibrosis, poor prognosis, and imatinib responsiveness. *Blood* 101:4660-4666, 2003
- Pardanani A, Reeder T, Porrata LF, et al: Imatinib therapy for hypereosinophilic syndrome and other eosinophilic disorders. *Blood* 101:3391-3397, 2003
- Joensuu H, Roberts PJ, Sarlomo-Rikala M, et al: Effect of the tyrosine kinase inhibitor STI571 in a patient with a metastatic gastrointestinal stromal tumor. *N Engl J Med* 344:1052-1056, 2001
- Demetri GD, von Mehren M, Blanke CD, et al: Efficacy and safety of imatinib mesylate in advanced gastrointestinal stromal tumors. *N Engl J Med* 347:472-480, 2002
- Ma Y, Zeng S, Metcalfe DD, et al: The c-KIT mutation causing human mastocytosis is resistant to STI571 and other KIT kinase inhibitors; kinases with enzymatic site mutations show different inhibitor sensitivity profiles than wild-type kinases and those with regulatory-type mutations. *Blood* 99:1741-1744, 2002
- Mol CD, Dougan DR, Schneider TR, et al: Structural basis for the autoinhibition and STI-571 inhibition of c-KIT tyrosine kinase. *J Biol Chem* 279:31655-31663, 2004
- Frost MJ, Ferrao PT, Hughes TP, et al: Juxtamembrane mutant V560GKit is more sensitive to imatinib (STI571) compared with wild-type c-kit whereas the kinase domain mutant D816VKit is resistant. *Mol Cancer Ther* 1:1115-1124, 2002
- Hartmann K, Wardelmann E, Ma Y, et al: Novel germline mutation of *KIT* associated with familial gastrointestinal stromal tumors and mastocytosis. *Gastroenterology* 129:1042-1046, 2005
- Mital A, Piskorz A, Lewandowski K, et al: A case of mast cell leukaemia with exon 9 KIT mutation and good response to imatinib. *Eur J Haematol* 86:531-535, 2011
- Pardanani A, Tefferi A: A critical reappraisal of treatment response criteria in systemic mastocytosis and a proposal for revisions. *Eur J Haematol* 84:371-378, 2010
- Jung AG, Horny HP, Sotlar K, et al: Imatinib mesylate for aggressive systemic mastocytosis with long bone osteolysis. *J Am Acad Dermatol* 65:224-226, 2011
- Escribano L, Álvarez-Twose I, Sánchez-Munoz L, et al: Prognosis in adult indolent systemic mastocytosis: A long-term study of the Spanish Network on Mastocytosis in a series of 145 patients. *J Allergy Clin Immunol* 124:514-521, 2009
- Pardanani A, Tefferi A: Systemic mastocytosis in adults: A review on prognosis and treatment based on 342 Mayo Clinic patients and current literature. *Curr Opin Hematol* 17:125-132, 2010
- Kiernan JA: Production and life span of cutaneous mast cells in young rats. *J Anat* 128:225-238, 1979

DOI: 10.1200/JCO.2011.38.9973; published online ahead of print at www.jco.org on February 27, 2012

3.3.3. IMATINIB IN SYSTEMIC MASTOCYTOSIS: A PHASE IV CLINICAL TRIAL IN PATIENTS LACKING EXON 17 KIT MUTATIONS AND REVIEW OF THE LITERATURE.

Iván Álvarez-Twose, Almudena Matito, José Mário Morgado, Laura Sánchez-Muñoz, María Jara-Acevedo, Andrés García-Montero, Andrea Mayado, Carolina Caldas, Cristina Teodósio, Javier Ignacio Muñoz-González, Manuela Mollejo, Luis Escribano y Alberto Orfao.

Oncotarget 2016

Publicado online el 19 de Julio; doi:10.18632/oncotarget.10711
(pendiente de transición al volumen definitivo)

Imatinib in systemic mastocytosis: a phase IV clinical trial in patients lacking exon 17 *KIT* mutations and review of the literature

Iván Alvarez-Twose^{1,5}, Almudena Matito^{1,5}, José Mário Morgado^{1,5}, Laura Sánchez-Muñoz^{1,5}, María Jara-Acevedo^{2,5}, Andrés García-Montero^{2,5}, Andrea Mayado^{2,5}, Carolina Caldas^{2,5}, Cristina Teodósio³, Javier Ignacio Muñoz-González^{2,5}, Manuela Mollejo^{4,5}, Luis Escribano^{2,5}, Alberto Orfao^{2,5}

¹Instituto de Estudios de Mastocitosis de Castilla La Mancha (CLMast), Hospital Virgen del Valle, Toledo, Spain

²Centro de Investigación del Cáncer/IBMCC (USAL/CSIC) and IBSAL, Departamento de Medicina and Servicio General de Citometría, University of Salamanca, Salamanca, Spain

³Department of Immunology, Erasmus Medical Center, University of Rotterdam, Rotterdam, The Netherlands

⁴Department of Pathology, Hospital Virgen de la Salud, Toledo, Spain

⁵Spanish Network on Mastocytosis (REMA), Toledo and Salamanca, Spain

Correspondence to: Iván Alvarez-Twose, email: ivana@sescam.jccm.es

Keywords: mast cell, mastocytosis, well-differentiated systemic mastocytosis, imatinib, *KIT*

Received: March 01, 2016

Accepted: May 29, 2016

Published: July 19, 2016

ABSTRACT

Resistance to imatinib has been recurrently reported in systemic mastocytosis (SM) carrying exon 17 *KIT* mutations. We evaluated the efficacy and safety of imatinib therapy in 10 adult SM patients lacking exon 17 *KIT* mutations, 9 of which fulfilled criteria for well-differentiated SM (WDSM). The World Health Organization 2008 disease categories among WDSM patients were mast cell (MC) leukemia ($n = 3$), indolent SM ($n = 3$) and cutaneous mastocytosis ($n = 3$); the remainder case had SM associated with a clonal haematological non-MC disease. Patients were given imatinib for 12 months –400 or 300 mg daily depending on the presence vs. absence of $> 30\%$ bone marrow (BM) MCs and/or signs of advanced disease-. Absence of exon 17 *KIT* mutations was confirmed in highly-purified BM MCs by peptide nucleic acid-mediated PCR, while mutations involving other exons were investigated by direct sequencing of purified BM MC DNA. Complete response (CR) was defined as resolution of BM MC infiltration, skin lesions, organomegalies and MC-mediator release-associated symptoms, plus normalization of serum tryptase. Criteria for partial response (PR) included $\geq 50\%$ reduction in BM MC infiltration and improvement of skin lesions and/or organomegalies. Treatment was well-tolerated with an overall response rate of 50%, including early and sustained CR in four patients, three of whom had extracellular mutations of *KIT*, and PR in one case. This later patient and all non-responders ($n = 5$) showed wild-type *KIT*. These results together with previous data from the literature support the relevance of the *KIT* mutational status in selecting SM patients who are candidates for imatinib therapy.

INTRODUCTION

Mastocytosis is a rare and heterogeneous disease characterized by an expansion of clonal mast cells (MCs) in different organs and tissues such as the bone marrow (BM), skin, gastrointestinal tract, liver, spleen and lymph

nodes. Based on the World Health Organization (WHO) 2008 classification, mastocytosis is subclassified into several categories including cutaneous mastocytosis (CM), and systemic mastocytosis (SM). SM is further subdivided into indolent SM (ISM), aggressive SM (ASM), SM associated with a clonal haematological

non-MC disease (SM-AHNMD), MC leukemia (MCL), MC sarcoma and a provisional subvariant of ISM termed smoldering SM (SSM) [1]. Most SM patients (~94%) show morphologically abnormal CD25⁺ BM MCs [2, 3] that carry *KIT* mutations [4–7], from which the *KIT* D816V is the most common one (~90% of SM cases) [6]. The later mutation involves the tyrosine kinase (TK) 2 domain of *KIT* and leads to constitutive ligand-independent activation of the *KIT* receptor [8]. Other mutations involving either exon 17 or other exons of *KIT* (e.g. exons 8, 9, 10 and 11), or a wild-type *KIT* receptor can be detected in a small percentage of SM patients (~3% and ~6%, respectively) [6, 9–18]. Of note, many of these D816V-negative patients correspond to well-differentiated SM (WDSM), a recently described rare subvariant of SM defined by skin involvement associated with clonal expansion of mature-appearing, CD25^{low} MCs in the BM, for which specific diagnostic criteria have been proposed [19] and adopted in the new WHO 2016 classification. Of note, a significant proportion of patients with indolent forms of WDSM fail to fulfill the current WHO 2008 diagnostic criteria for SM, despite they systematically show features of a systemic MC disease such as BM MC aggregates, aberrant CD30 expression on BM MCs, mutations involving any region of *KIT* and/or a clonal nature based on the HUMARA pattern of inactivation of the X chromosome.

In the last decade, TK inhibitor (TKI) targeted-therapy (e.g. imatinib mesylate) has become the front-line treatment for several TK-driven diseases such as chronic myeloid leukemia (CML) [20], gastrointestinal stromal tumor (GIST) [21] and chronic eosinophilic leukemia (CEL)/hypereosinophilic syndrome (HES) [22]. The outstanding clinical responses obtained in these diseases have led to explore the potential utility of TKI also in mastocytosis. Data from single case reports and small series of mastocytosis patients treated with imatinib prompted the U.S. Food and Drug Administration (FDA) to approve in 2006 its use in adults with ASM lacking the D816V *KIT* mutation or with unknown *KIT* mutational status. Since then, the number of reports about D816V-negative patients showing no response to imatinib has significantly increased, while the responding cases among D816V-negative patients include both cases with ASM as well as patients with non-advanced forms of mastocytosis.

Here we report the results of an investigator-initiated clinical trial that evaluated the efficacy of imatinib targeted therapy in 10 patients with SM –9 patients with WDSM (including 3 CM, 3 ISM and 3 MCL) and one SM-AHNMD– lacking mutations at exon 17 of the *KIT* gene selected from 453 consecutive patients diagnosed with SM. Due to the rarity of these SM cases lacking exon 17 *KIT* mutations ($\leq 4\%$) [6], a critical review of mastocytosis cases treated with imatinib who have been reported in the literature is also provided to better estimate the response rates to imatinib according to the *KIT* mutational status.

RESULTS

Clinical presentation

Overall, 9/10 patients had WDSM according to recently proposed criteria [19] consisting of histologically-proven mastocytosis in the skin and BM compact aggregates of mature-appearing CD25^{low}/CD2^{low} MCs, together with clusters of ≥ 2 MCs outside BM particles ($n = 9$), aberrant expression of CD30 and/or overexpression of cytoplasmic proteases ($n = 4$), mutations involving exons other than exon 17 of *KIT* ($n = 3$), a clonal HUMARA pattern of inactivation of X chromosome ($n = 3$), and/or female sex with either pediatric disease onset ($n = 7$) and/or familial aggregation ($n = 4$). According to the WHO 2008 classification [1], these 9 patients were subclassified as having MCL ($n = 3$), ISM ($n = 3$) and CM ($n = 3$) (Table 1). Except for a patient who presented with an adult-onset mastocytoma in her right arm, all other WDSM patients referred pediatric-onset of mastocytosis-associated maculopapular skin lesions in 5 cases and diffuse cutaneous mastocytosis lesions with generalized thickening of the skin in the other 3 patients (Table 1 and Figure 1). Of note, these three later patients included two sisters and their father, who had also an associated GIST.

The remainder patient was a 37 year-old male with neither mastocytosis skin lesions nor MC-mediator release symptoms who had a 5-year history of sustained eosinophilia and increased serum tryptase (sT) levels. At referral, he showed a peripheral blood (PB) eosinophil count of $5.2 \times 10^9/L$, increased sT levels (32 $\mu g/L$) and splenomegaly (17.5 cm). BM aspirate and biopsy analyses revealed a hypercellular marrow with increased eosinophils together with the presence of CD25^{bright}, spindle-shaped MCs forming compact aggregates consistent with the diagnosis of ISM-AHNMD, the associated haematological disorder being a CEL (ISM-CEL).

At diagnosis, the most frequent MC-mediator release-associated symptoms were: pruritus ($n = 7$), flushing ($n = 6$), abdominal cramping ($n = 4$), diarrhea ($n = 4$) and anaphylaxis ($n = 3$) (Table 1 and Figure 3). Only 2/10 patients had bone mass loss consisting of osteopenia (case #5) and osteoporosis (case #10).

Overall, 6 patients (3 advanced WDSM, 2 indolent WDSM and the ISM-CEL case) received an initial dose of imatinib of 400 mg imatinib per day, while the other 4 WDSM patients received 300 mg imatinib per day (Table 1).

KIT mutational status and additional genetic studies

As per the inclusion criteria, none of the 10 patients showed mutations involving exon 17 of *KIT*. Further

Table 1: Clinical, biological and molecular characteristics at diagnosis and response to imatinib therapy of the 10 patients included in this study

Findings	Case #1	Case #2	Case #3	Case #4	Case #5	Case #6	Case #7	Case #8	Case #9	Case #10
Sex	M	F	F	M	F	F	F	F	F	F
Age at onset/diagnosis‡	Birth/55 y	3 mo/27 y	3 mo/20 y	32 y/37 y	1 y/24 y	4 y/26 y	14 y/21 y	2 y/26 y	10 mo/21 y	60 y/69 y
Skin lesions	DCM	DCM	DCM	No	MPCM*	MPCM*	MPCM*	MPCM*	MPCM*	Cutaneous mastocytoma
Baseline MC-mediator release symptoms	P,GI,D	P,FI,GI,D	P,D	No	FI,A	P	P,F	P,FI,GI,D,A	P,FI,GI	FI,A
BM MC aggregates	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
>20% of MCs in BM smears	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No	No	Yes
BM MC morphology	Normal	Normal	Normal	Abnormal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
BM MC phenotype	CD2- CD25- CD30+	CD2- CD25- CD30+	CD2- CD25- CD30+	CD2- CD25 ⁺ CD30+	CD2- CD25-	CD2- CD25-	CD2- CD25-	CD2 ⁺ CD25 ⁺ CD30+	CD2 ⁺ CD25 ⁺ CD30+	CD2 ⁺ CD25 ⁺ CD30+
KIT mutation	K509I	K509I	K509I	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative
HUMARA	NA	NA	Polyclonal	NA	Clonal	Polyclonal	Clonal	Clonal	Polyclonal	Polyclonal
Organomegalies	No	No	No	S	L	No	No	No	L	No
C-findings	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No
Associated diseases	GIST	GIST	GIST	CEL	No	No	No	No	No	No
WHO diagnostic subtype	MCL	MCL	ISM	SM-AHNMD	CM	CM	CM	ISM	ISM	MCL
WDSM criteria [19]	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Advanced MC disease†	Yes	Yes	No	Yes	No	No	No	No	No	Yes
Prior therapies	DCG,H1	DCG,H1	DCG,H1	HU,CS	DCG,H1	H1	H1	DCG,H1	DCG,H1	DCG,H1, H2,LTA
Imatinib dosage (mg/day)										
Initial prescribed dosage	400	400	400	400	300	300	300	300	400	400
Dosage reduction	No	300	300	300	No	No	No	No	No	300
BM MCs by IHC (%)										
Before imatinib	60	80	20	15	5	5	5	5	40	65
+6 mo	<1	<1	<1	<1	NA	NA	NA	NA	40	80
+12 mo	<1	<1	<1	<1	3	5	5	5	NA	NA
BM MCs by FC (%)										
Before imatinib	7	13	0.78	0.28	0.01	0.02	0.01	0.06	0.4	14
+6 mo	0.02	0.007	0.0009	0.0009	NA	NA	NA	NA	0.4	19
+12 mo	0.01	0.003	0.0005	0.0007	0.005	0.03	0.03	0.09	NA	NA
sT levels (µg/L)										
Before imatinib	90.9	126	43.8	46.9	18.1	11.0	8.6	16.7	386	196
+6 mo	3.2	4.9	1.6	2.3	14.7	9.6	4.8	10.5	385	244
+12 mo	1.6	3.1	1.4	1.8	14.7	9.5	4.8	8.9	NA	NA
Response to therapy (+6 mo/+12 mo)	CR/CR	CR/CR	CR/CR	CR/CR	NA/PR	NA/NR	NA/NR	NA/NR	NR/NA	NR/NA

M, male; F, female; y, years; mo, months; DCM, diffuse cutaneous mastocytosis; MPCM, maculopapular cutaneous mastocytosis; P, pruritus; FI, flushing; GI, gastrointestinal pain; D, diarrhea; A, anaphylaxis; BM, bone marrow; MC, mast cell; HUMARA, human androgen receptor assay; NA, not assessed/applicable; S, splenomegaly; L, hepatomegaly; GIST, gastrointestinal stromal tumor; CEL, chronic eosinophilic leukemia; WHO, World Health Organization; MCL, mast cell leukemia; ISM, indolent systemic mastocytosis; SM-AHNMD, systemic mastocytosis with associated clonal hematological non-MC disease; CM, cutaneous mastocytosis; WDSM, well-differentiated systemic mastocytosis; DCG, disodium cromoglycate; H1, H1 blockers; HU, hydroxyurea; CS, corticosteroids; H2, H2 blockers; LTA, leukotriene antagonists; IHC, immunohistochemistry; FC, flow cytometry; sT, serum tryptase; CR, complete response; PR, partial response; NR, no response.

‡Age at onset was defined as that at which mastocytosis-associated features (e.g. increased serum tryptase for patient #4 and emergence of skin lesions for the remaining patients) were first noticed, while age at diagnosis as that at which systemic disease was confirmed by BM studies.

*These cases corresponded to the monomorphic variant of MPCM according to a novel consensus classification of CM proposed by the ECNM [24].

†Defined as the presence of C-findings, > 20% of MCs in BM smears and/or an associated clonal non-MC lineage haematological disease.

sequencing of other *KIT* exons revealed a germline K509I mutation (exon 9) in the 3 familial WDSM patients (Table 1). In the SM-CEL patient, Janus kinase 2 (*JAK-2*) gene mutations, rearrangements of the platelet-derived growth factor receptor (*PDGFR*) α and β genes, and T-cell clonality were ruled out, while genetic analyses for the fibroblast growth factor receptor 1 (*FGFR1*) gene were not performed.

Toxicity

Imatinib was reduced from 400 mg to 300 mg in 2 patients (cases #2 and #3) due to grade 3 gastrointestinal symptoms. In another two patients receiving 400 mg/day (cases #4 and #10), treatment was transiently stopped due to grade 4 neutropenia and grade 4 anemia which were successfully recovered with G-CSF support and red

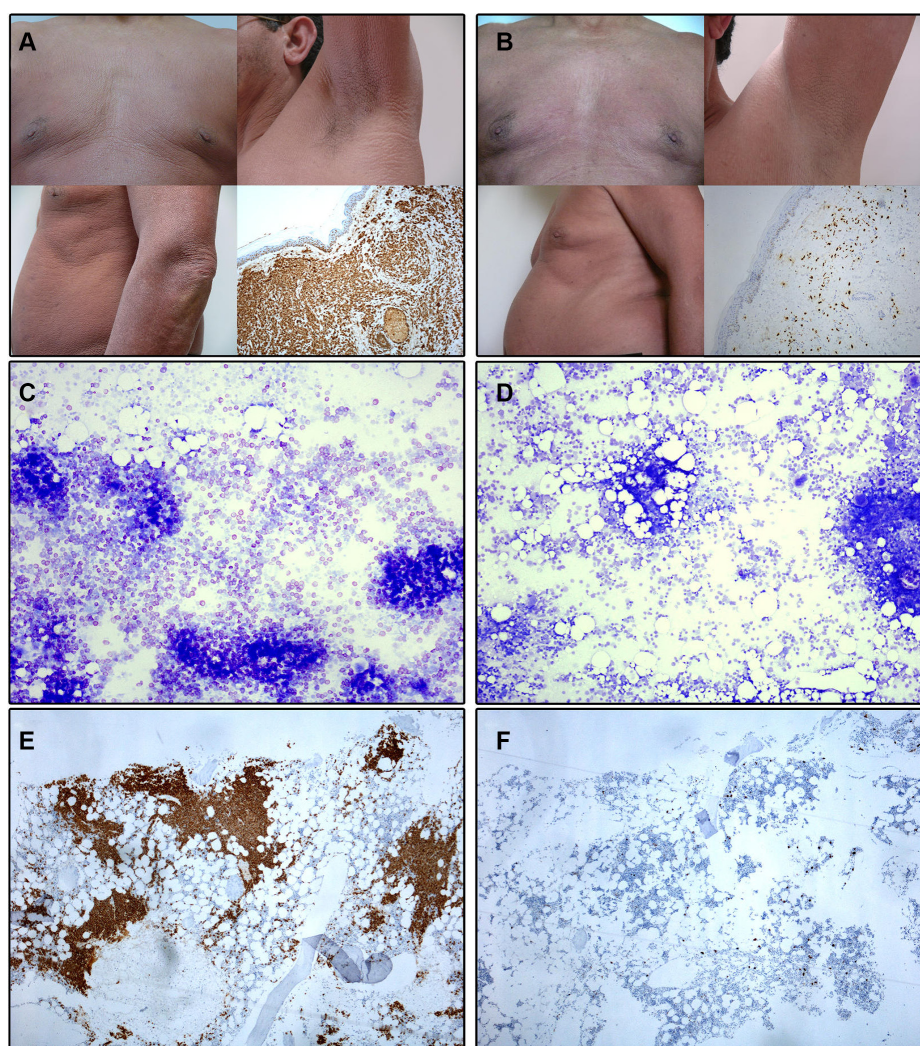


Figure 1: Illustrating skin and bone marrow microscopic images obtained before and at month +12 of imatinib therapy in a patient with advanced WDSM who achieved CR (case #1). (A–B) Macroscopic appearance of the skin and histological findings of skin biopsy (tryptase stain, 100x magnification) at diagnosis (A) and after imatinib therapy (B). (C–D) BM smears (toluidine blue stain, 100x magnification) at diagnosis (C) and after imatinib therapy (D). (E–F) BM sections (c-kit stain, 100x magnification) at diagnosis (E) and after imatinib therapy (F).

blood cell transfusions, respectively; afterward, imatinib was reintroduced in both cases at 300 mg/day with no further haematological toxicity. Grade ≤ 2 adverse events included: muscle cramps (70%), nausea (50%), edema (40%), skin rash (20%), alopecia (20%), dyspepsia (10%) and abdominal pain (10%).

Response to therapy

Overall, objective responses were obtained in 5/10 patients including CR in 4 of the 5 responder patients (2 advanced WDSM, 1 indolent WDSM and the

SM-CEL patient), and PR in another indolent WDSM case (Table 1). All 4 patients who achieved CR showed complete clearance of BM MC infiltrates (together with negative expression of CD25 on BM MCs and a dramatic decrease of BM eosinophil counts in the SM-CEL patient) at month +6 of therapy; in all four cases, CR was maintained at month +12 of therapy (Table 1 and Figures 1 and 2). In parallel, all four CR cases also showed early normalization of sT levels (Table 1 and Figure 2), as well as complete disappearance of MC-mediator release-associated symptoms (Figure 3) and gradual improvement of skin lesions in those 3 patients who had cutaneous

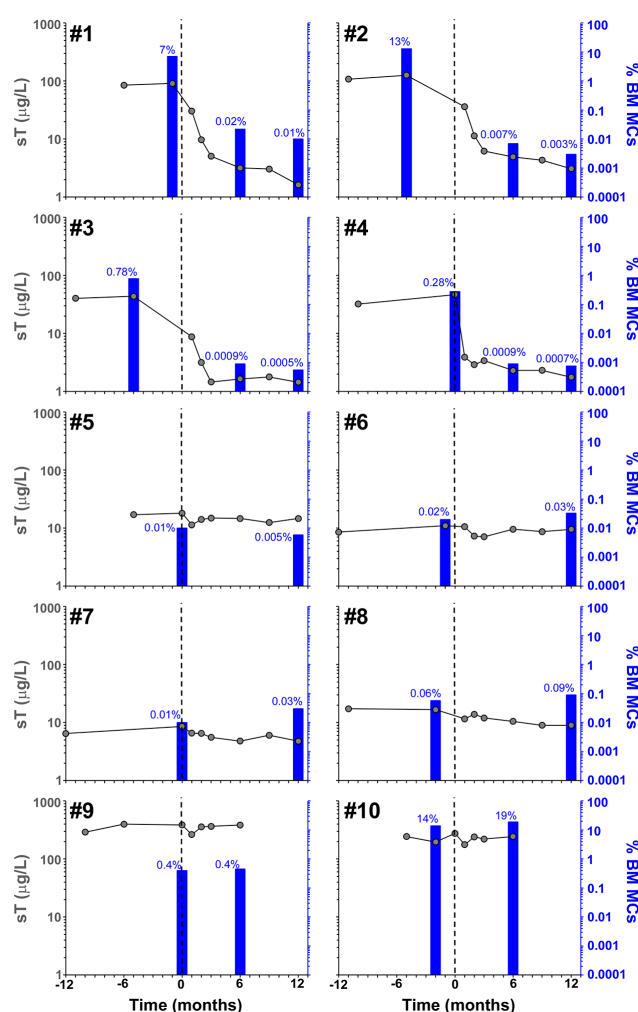


Figure 2: Effect of imatinib therapy on BM MC counts and sT levels in the 10 patients included in the present clinical trial. Vertical dotted lines indicate start of imatinib therapy, blue bars and grey dots represent the percentage of pathologic/aberrant BM MCs as assessed by flow cytometry and sT values, respectively, before and after imatinib therapy.

involvement, as histologically confirmed at the end of the study (Figure 1). Noteworthy, treatment with imatinib was continued beyond the end of the study in these 3 later patients because of the presence of an associated GIST. At last follow-up (e.g. 72 months after initiation of imatinib

in case #1 and 66 months after starting on imatinib in cases #2 and #3), all three patients still showed sT levels < 5 µg/L, normal skin appearance and neither MC-mediator release symptoms nor drug-associated long-term side effects; although no further BM studies were performed,

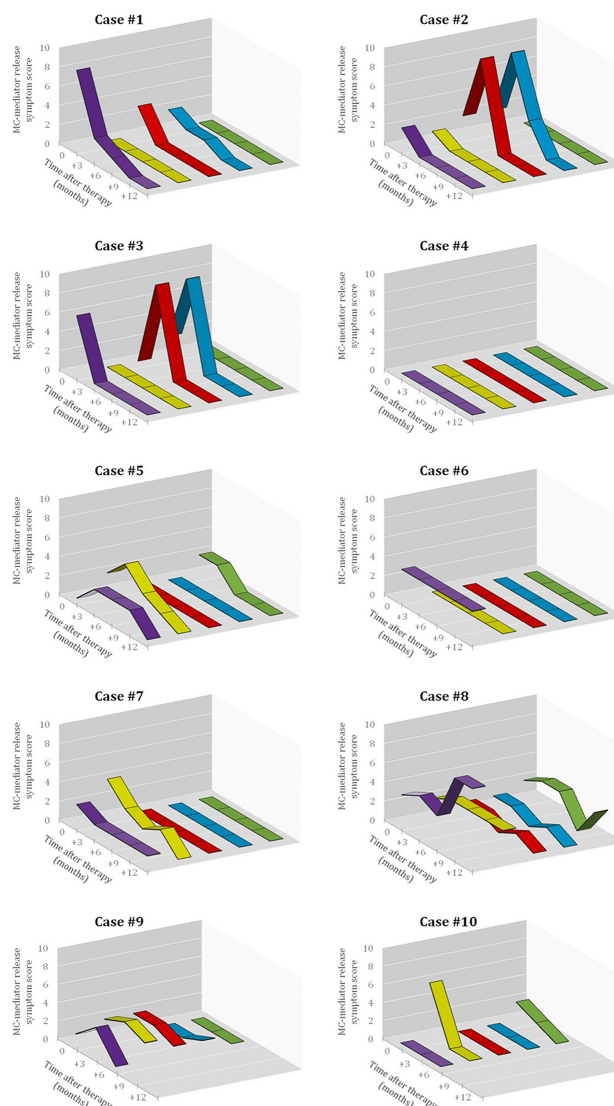


Figure 3: Effect of imatinib therapy on MC-mediator release associated symptoms in the 10 patients included in the present clinical trial. Symptomatic response was evaluated in each patient before starting imatinib and every 3 months thereafter using Likert-type scales obtained from specific questionnaires designed by the REMA, by which MC-mediator release symptoms (e.g. pruritus, purple lane; flushing, yellow lane; abdominal cramping, red lane; diarrhea, blue lane; and anaphylaxis, green lane) were graded as described in detail in the Methods section. The X-axis represents the different time-points at which the questionnaires were collected, while the Y-axis represents the overall score (i.e. the frequency score multiplied by the severity score) for each MC-mediator release-associated symptom.

these findings suggest that they remained in continuous CR of their SM. In turn, repeated CT scans during the follow-up period showed no significant changes of GIST lesions in these three patients. In the SM-CEL case, the PB eosinophil count decreased to $0.1 \times 10^9/L$ after 4 weeks of therapy and remained below $0.4 \times 10^9/L$ thereafter; in addition, splenomegaly had disappeared at the end of the study. In view of these results imatinib was discontinued, and both eosinophil counts as well as sT levels remained within normal range for 5 additional years. Of note, in 3/4 CR patients, *KIT* mutations in exon 9 had been detected (Table 1).

The only patient who attained PR showed 50% decrease of BM MCs by flow cytometry (Table 1 and Figure 2) in the absence of BM MC aggregates, together with resolution of pre-existing (mild) hepatomegaly. In parallel, sT levels decreased by 20% (Table 1 and Figure 2), MC-mediator release-associated symptoms completely disappeared (Figure 3) and modest fading of skin lesions was observed at month +12. The patient kept under imatinib treatment for one additional year, during which no further MC-mediator release-associated symptoms occurred and both sT levels and skin lesions remained stable; thereafter, she decided to get pregnant and thereby, treatment was discontinued.

Among the 5 non-responders, imatinib was discontinued at month +6 of therapy in two patients with advanced SM due to lack of response upon BM re-evaluation (Table 1 and Figure 2). Despite this, both patients showed improvement of symptoms at that time (Figure 3). In the remaining 3 patients who completed the trial, neither a significant reduction of BM MC numbers (Table 1 and Figure 2), nor changes in skin lesions were observed. Despite this, sT levels decreased in all 3 patients by 13%, 44% and 46% (Table 1 and Figure 2), in parallel to a mild decrease of MC-mediator release-associated symptoms in one patient (Figure 3). All five refractory patients had wild-type *KIT* (Table 1).

DISCUSSION

Currently, SM remains an incurable disease. SM patients are typically managed with drugs aimed at improving and/or preventing symptoms related to the release of MC mediators, together with cytoreductive therapy in advanced cases (e.g. ASM, MCL and SM-AHNMD). Interferon- α and cladribine are the most commonly used cytotoxic agents to decrease MC tumor load in advanced SM patients; unfortunately, objective responses occur in only 20–30% of cases and these typically consist of transient PR [25, 26].

In the last decade, TKI targeted-therapy (e.g. imatinib mesylate) has emerged as a new promising treatment approach for a subset of mastocytosis patients. *In vitro* studies on MC lines and human BM MCs have shown that imatinib inhibits phosphorylation of *KIT* and

growth of MCs with wild-type *KIT* or mutations localized outside the activation loop (e.g. exon 17) of *KIT* such as the V560G, F522C, K509I or p.419del mutations [10–12, 27–29]; in contrast, the D816V *KIT* mutation confers constitutive resistance to the drug [30]. These preclinical findings correlated well with early reports showing response to imatinib in 18/26 patients (69%) who either lacked or were not screened for the D816V *KIT* mutation vs. 1/4 D816V-positive cases (25%) [12, 31–39]. These observations led to the approval by the FDA of imatinib for adult ASM patients who have no D816V *KIT* mutation or with unknown *KIT* mutational status; however, it should be noted that 10 out of those 18 responding cases previously evaluated by the FDA who were negative or not tested for the D816V *KIT* mutation, showed either the FIP1L1/PDGFR α fusion gene ($n = 8$) or juxtamembrane *KIT* mutations ($n = 2$), which might have contributed to an overestimation of the impact of the absence of the D816V *KIT* mutation itself in the response to imatinib in that series of patients.

To date, 121 mastocytosis patients, plus the 10 patients studied here, have been reported as being treated with imatinib for a total of 131 cases; from them, response to therapy data is publicly available for 128/131 patients (Table 2). The overall reported response rate to imatinib among patients with either no D816V *KIT* mutation or unknown *KIT* mutational status vs. D816V *KIT* mutation-positive patients is of 57% vs. 46%, respectively. However, highly heterogeneous response criteria have been used in different reports, e.g. while in some reports response to imatinib was defined by a substantially reduced degree of BM MC infiltration, in other series, patients were classified as responders whenever they showed improvement of symptoms related to the release of MC mediators after treatment. Such variability is due, at least in part, to the lack of consensus treatment response criteria for mastocytosis until 2007, when a first proposal was formulated [40]. More recently, specific response criteria for advanced mastocytosis have been redefined by the International Working Group–Myeloproliferative Neoplasms Research and Treatment (IWG-MRT) and the European Competence Network on Mastocytosis (ECNM) [41]; in turn, response criteria in terms of MC tumor load are still lacking for patients with non-aggressive (e.g. CM and ISM) forms of mastocytosis. In the trial here described, homogeneous and well-defined response criteria were used to evaluate both the reduction in BM MC burden and the improvement of symptoms related to the activation of MCs, as described above in detail. In addition, sequencing of exons other than exon 17 of *KIT* in highly-purified BM MCs [4, 23] allowed for reliable discrimination between those three cases who had *KIT* mutations involving exon 9 of *KIT* (e.g. K509I) and the seven patients with wild-type *KIT*.

Overall, half of our cases showed response to imatinib, this consisting of CR by the recent ECNM

Table 2: Response to imatinib in mastocytosis patients included in the present study and in previous reports

Year	Ref	Number of patients						Reported responses						Response referred to as MC cytoreduction						
		Total	WDSM features	Codon 816 KIT mutation	Exon 8-10 KIT mutations	PDGFR alterations	Type of response					Response rate		Type of response					Response rate	
							CR	PR	NR	NA	ORR‡	CRR	CR	PR	NR	NA	ORR‡	CRR		
2003	[31]	1†	NA	NA	NA	NA	0	0	1	0	0/1	0/1	0	0	1	0	0/1	0/1		
2003	[32, 33]	12†	NA	2	0	3	3	4	3	2	7/10	3/10	3	2	2	5	5/7	3/7		
2004	[34]	1†	0	0	NA	1	1	0	0	0	1/1	1/1	1	0	0	0	1/1	1/1		
2004	[35]	3†	NA	0	0	0	0	2	1	0	2/3	0/3	0	0	0	3	NA	NA		
2004	[36]	1†	NA	1	NA	NA	0	0	1	0	0/1	0/1	0	0	1	0	0/1	0/1		
2004	[10]	1†	1	0	1	NA	0	1	0	0	1/1	0/1	0	1	0	0	1/1	0/1		
2004	[37]	9†	NA	2	NA	4	4	0	5	0	4/9	4/9	1	0	5	3	1/6	1/6		
2005	[38]	1†	0	1	0	NA	1	0	0	0	1/1	1/1	1	0	0	0	1/1	1/1		
2006	[12]	1†	1	0	1	NA	0	1	0	0	1/1	0/1	0	0	0	1	NA	NA		
2006	[45]	14	NA	11	NA	1	1	10	3	0	11/14	1/14	0	3	6	5	3/9	0/9		
2006	[46]	1	0	0	NA	1	1	0	0	0	1/1	1/1	0	0	0	1	NA	NA		
2006	[47]	1	NA	0	NA	1	1	0	0	0	1/1	1/1	0	0	0	1	NA	NA		
2007	[65]	1	NA	NA	NA	NA	0	0	1	0	0/1	0/1	0	0	1	0	0/1	0/1		
2007	[63]	1	0	NA	NA	1	1	0	0	0	1/1	1/1	1	0	0	0	1/1	1/1		
2007	[64]	1	NA	NA	NA	NA	0	1	0	0	1/1	0/1	0	1	0	0	1/1	0/1		
2008	[62]	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1/1	1/1	1	0	0	0	1/1	1/1		
2008	[48]	1	0	0	NA	NA	0	1	0	0	1/1	0/1	0	0	0	1	NA	NA		
2008	[49]	17	NA	NA	NA	NA	1	4	12	0	5/17	1/17	1	4	12	0	5/17	1/17		
2008	[46]	1	NA	0	1	NA	0	1	0	0	1/1	0/1	0	0	0	1	NA	NA		
2008	[39]	5†	NA	5	0	0	0	1	4	0	1/5	0/5	0	0	0	5	NA	NA		
2008	[50]	5	0	3	NA	NA	0	2	3	0	2/5	0/5	0	0	0	5	NA	NA		
2009	[66]	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0/1	0/1	0	0	0	1	NA	NA		
2009	[51]	20	0	13	NA	0	1	6	13	0	7/20	1/20	1	0	19	0	1/20	1/20		
2011	[17]	1	1	0	1	NA	0	1	0	0	1/1	0/1	0	1	0	0	1/1	0/1		
2011	[52]	1	0	0	NA	NA	0	1	0	0	1/1	0/1	0	0	0	1	NA	NA		
2011	[53]	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1/1	1/1	1	0	0	0	1/1	1/1		
2012	[42]	2	0	0	1	NA	1	0	1	0	1/2	1/2	1	0	1	0	1/2	1/2		
2012	[18]	1	1	0	0	NA	1	0	0	0	1/1	1/1	1	0	0	0	1/1	1/1		
2012	[58]	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0/1	0/1	0	0	1	0	0/1	0/1		
2012	[67]	1	0	NA	NA	NA	0	0	1	0	0/1	0/1	0	0	1	0	0/1	0/1		
2013	[16]	1	NA	0	1	0	0	0	0	1	NA	NA	0	0	0	1	NA	NA		
2013	[54]	1	0	0	NA	NA	1	0	0	0	1/1	1/1	1	0	0	0	1/1	1/1		
2013	[43]	2	NA	0	2	NA	2	0	0	0	2/2	2/2	0	0	0	2	NA	NA		
2013	[55]	1	NA	0	NA	0	0	1	0	0	1/1	0/1	0	0	0	1	NA	NA		
2013	[59]	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0/1	0/1	0	0	1	0	0/1	0/1		
2014	[14]	1	1	0	1	NA	1	0	0	0	1/1	1/1	1	0	0	0	1/1	1/1		
2014	[15]	2	2	0	2	NA	2	0	0	0	2/2	2/2	2	0	0	0	2/2	2/2		
2014	[60]	1	0	0	NA	0	0	0	1	0	0/1	0/1	0	0	1	0	0/1	0/1		
2014	[56]	1	0	0	0	NA	0	1	0	0	1/1	0/1	0	0	0	1	NA	NA		
2015	[57]	1	NA	0	0	0	0	1	0	0	1/1	0/1	0	0	0	1	NA	NA		
2015	[61]	1	0	0	0	NA	0	0	1	0	0/1	0/1	0	0	1	0	0/1	0/1		
2016	*	10	9	0	3	NA	4	1	5	0	5/10	4/10	4	1	5	0	5/10	4/10		
	Total	131	16	39	14	13	29	40	59	3	69/128	29/128	21	13	58	39	34/92	21/92		
											(53%)	(23%)					(37%)	(23%)		

Ref, reference number in this manuscript; N, number of patients; WDSM, well-differentiated systemic mastocytosis; PDGFR, platelet-derived growth factor receptor; MC, mast cell; CR, complete response; PR, partial response; NR, no response; NA, not available; ORR, overall response rate; CRR, complete response rate.

*This study corresponds to the clinical trial here reported.

†Cases evaluated by the FDA. The study with reference number [39] was a manufacturer-sponsored clinical trial whose results were published after FDA approval.

‡ORR is defined as the proportion of patients who achieve CR or PR.

consensus criteria [41] in all but one case. Interestingly, except for one patient with SM-CEL, CR was restricted to WDSM patients showing mutations in exon 9 (K509I) of *KIT*, whereas all non-responder cases had wild-type *KIT*. To date, 7 adult SM patients showing mutations at exons other than exon 17 of *KIT* (exons 9 and 10) have been reported to be treated with imatinib. Five patients had the K509I *KIT* mutation (3 ISM, 1 ASM and 1 MCL) [12, 14–16], 1 ASM patient had the F522C *KIT* mutation [10] and 1 MCL patient carried the p.A502-Y503dup at exon 9 [17]. One of the ISM patients carrying the K509I mutation had a concomitant GIST that did not respond to imatinib, and the response of ISM was not assessed/ reported in this case [16]. Interestingly, SM and GIST also coexisted in our 3 familial cases who had the K509I mutation; in these 3 cases SM showed CR but the GISTs were unresponsive to imatinib. In the other 6 previously reported patients with exon 9 or 10 *KIT* mutations, CR or near CR of mastocytosis was reported [10, 12, 14, 15, 17]. Of note, all 6 responding patients reported previously, as well as the three K509I⁺ patients who achieved CR in our series, were diagnosed with WDSM or had features highly suggestive of such variant of SM (e.g. childhood onset, female gender, familial aggregation and mature-appearing, round shape CD25⁺ BM MCs), supporting the close association of mutations involving the extracellular membrane and transmembrane domains of the *KIT* gene with WDSM [19]. Similarly, objective responses to imatinib have been also reported in 3 children with CM and 1 adult patient with MC sarcoma showing deletion of codon 419 (p.419del) in exon 8 of *KIT*, a region located within the extracellular domain of the gene [42–44]. Altogether, these findings suggest that the presence of mutations involving the extracellular and transmembrane domains of *KIT* (exons 8 to 10) is strongly associated with response to imatinib in mastocytosis.

In contrast, our results also suggest that response to imatinib among SM patients who have wild-type *KIT* is limited, with only 1/6 cases achieving PR. Overall, 46 patients with mastocytosis lacking the D816V *KIT* mutation and other extracellular membrane/transmembrane *KIT* mutations who were treated with imatinib and further evaluated for response to therapy have been reported, with an overall response rate of 80% (37/46 cases) [18, 32–35, 37, 42, 45–62]. However, almost one third of such responding cases corresponded to patients with SM associated with either HES/CEL ($n = 11/37$) [32, 34, 37, 45–47] or chronic basophilic leukemia ($n = 1/37$) [68] carrying rearrangements of *PDGFRα/β*; in turn, another 10/37 patients only showed improvement of MC-mediator release-associated symptoms and/or skin lesions [32, 48, 51, 52, 55, 57]. Among the remaining 15 cases, 5 fulfilled criteria for CR [18, 49, 51, 53, 54] and 10 were reported to have PR [32, 45, 49, 50, 56]. It should be noted that unlike CR, which was defined in all reports by the disappearance of all mastocytosis-related signs and

symptoms together with decrease of sT levels to $< 20 \mu\text{g/L}$, criteria used for establishing PR were more heterogeneous, a significant reduction of BM MC infiltrates being documented in only 4/10 PR patients [32, 45]. Altogether, these observations suggest that applying the more strict response criteria used in the present study, previously reported response of D816V-negative patients to imatinib therapy would probably had been lower. In fact, when only those patients who showed significant MC cyto-reduction (e.g. $\geq 50\%$) after therapy are considered, and those with *PDGFR* rearrangements are excluded, the overall response rate to imatinib decreases to 25%, which is quite similar to that found in our clinical trial for this patient subgroup. A potential explanation for this low “true” response rate among patients who apparently carried wild-type *KIT* could be the use of inadequate methods (e.g. Sanger sequencing) for the detection of the D816V *KIT* mutation, particularly in cases with low MC burden.

In turn, only 5/34 (15%) adult mastocytosis patients who were not screened for the *KIT* mutation have been reported so far to respond to imatinib [31, 35, 63, 64]. Two of these patients only had transient improvement of symptoms [35], one had CM associated with HES and actually showed CR of HES with persistence of (cutaneous) mastocytosis lesions [31], one ASM patient with an associated eosinophilia and *PDGFRβ* gene rearrangement achieved CR [63], and the remaining patient showed PR consisting of 50% reduction of BM MC counts after therapy [64]. Following the same considerations as described above for the D816V-negative patients, the “true” response rate (e.g. as defined by $\geq 50\%$ MC cyto-reduction) among patients with unknown *KIT* mutational status and no imatinib-sensitive mutations involving other genes (e.g. *PDGFR*) would decrease to only 3% (1/34 cases). Thereby, the estimated probability of lack of response to imatinib among patients who were not screened for *KIT* mutations is of 97%, which correlates with the expected frequency of exon 17 *KIT* mutations (~94%) in SM, when highly-sensitive and robust PCR-based methods are used [4–7].

Although response to imatinib has been also reported in 13/28 patients (46%) with exon 17 *KIT* mutations [38, 39, 45, 50, 51], most of such responses were purely symptomatic, a significant reduction (e.g. $\geq 50\%$) in BM MC infiltration after therapy being documented in only 3 cases (11%) [38, 45]. Of note, among all such cases, the only patient who showed CR presented with an associated imatinib-sensitive BCR/ABL-positive CML [38].

In summary, our observations together with previous data from the literature suggest that the efficacy of imatinib in terms of reducing MC tumor load in SM patients lacking the D816V *KIT* mutation, relies on the existence of imatinib-sensitive genetic defects such as extracellular membrane/transmembrane *KIT* mutations or *PDGFR* gene rearrangements, rather than on the absence of the *KIT* D816V mutation by itself. Thus, the

few responses reported in true D816V-negative patients who were only screened for mutations in exon 17 of the *KIT* gene, could be most likely related to the presence of already-known (unexplored) imatinib-sensitive *KIT* and/or *PDGFR* mutations, or still undiscovered imatinib-sensitive mutations in genes other than *KIT*. Importantly, since objective responses to imatinib have also been obtained in ISM [14, 15, 18, 45, 54] SSM [45], MCL [15, 17] and SM-AHNMD [32, 34, 37, 38, 51, 62, 63], it seems reasonable that imatinib therapy should not be restricted to patients with ASM, whenever imatinib-sensitive molecular alterations are detected.

MATERIALS AND METHODS

Inclusion and exclusion criteria

The inclusion criteria used in this phase IV, open-label, uncontrolled clinical trial with imatinib (clinicaltrials.gov #NCT01297777) were as follows: 1) age ≥ 18 years; 2) diagnosis of systemic MC disease according to the WHO 2008 diagnostic criteria [1] and more recent criteria for WDSM [19], and; 3) absence of exon 17 *KIT* mutation. According to such criteria, all adult patients fulfilling the WHO 2008 diagnostic criteria for SM (with or without WDSM) and those who met the WDSM criteria (even when the WHO 2008 diagnostic criteria were not strictly fulfilled in the presence of a significant MC burden in ≥ 2 tissues), were eligible for participating in the study, independently from the type and severity of MC mediator-release symptoms and the levels of sT, whenever mutations at exon 17 of the *KIT* gene were ruled out. For the purposes of this study, patients within the ASM, MCL or SM-AHNMD disease categories according to the WHO 2008 classification of mastocytosis are also referred to as having advanced disease, as proposed elsewhere [41]; otherwise, patients were considered as having non-advanced disease.

Additionally, the following exclusion criteria were used: 1) previous treatment with TKI; 2) serum positivity for the human immunodeficiency virus (HIV) or active viral hepatitis; 3) impaired liver function, defined as serum bilirubin levels ≥ 2 mg/dL and/or aspartate transaminase (AST) or alanine transaminase (ALT) ≥ 3 times upper normal limit; 4) impaired renal function, defined as serum creatinine ≥ 2 mg/dL; 5) grade ≥ 3 cytopenias not related to mastocytosis; 6) severe cardiopathy (grade III/IV of New York Heart Association –NYHA–, or left ventricular ejection fraction $< 50\%$); 7) pregnancy or breastfeeding, and; 8) female patients not using contraceptive methods.

Patients

Ten adult patients (2 males, 8 females) selected from a group of 453 consecutive SM patients followed at the Spanish Network on Mastocytosis (REMA) were enrolled

in the study between January 2011 and August 2011. All patients were treated on an intention-to-cure basis, regardless of the prognostic impact of the specific subtype of mastocytosis or the severity of MC-mediator release-associated symptoms. Each patient gave his/her written informed consent to participate in the study, which was approved by the local institutional Ethics Committee (Complejo Hospitalario de Toledo, Toledo, Spain) where the trial took place.

Screening for *KIT* mutations

Absence of the D816V *KIT* mutation and other exon 17 *KIT* mutations was confirmed in genomic DNA extracted from fluorescence-activated cell sorting (FACS)-purified BM MCs by a previously described peptide nucleic acid (PNA)-mediated polymerase chain reaction (PCR) technique [4]. Mutations involving other exons of *KIT* were also investigated by direct sequencing of PCR products using the Sanger method [23], such mutations being detected in 4/10 cases.

Treatment protocol and follow-up schedule

Patients who showed $> 30\%$ BM MC infiltration by immunohistochemistry, advanced disease (defined by the presence of C-findings, $> 20\%$ of MCs in BM smears and/or an associated non-MC lineage hematological disease) and/or another malignant mastocytosis-associated disease (e.g. GIST), received 400 mg/day of imatinib orally for 12 months ($n = 6/10$); otherwise, a standard dose of 300 mg/day was administered for 12 months ($n = 4/10$). Among those patients selected to receive 400 mg/day of imatinib, treatment was discontinued whenever $< 10\%$ decrease in BM MC tumor load by flow cytometry had been achieved at month +6 of therapy. Potential treatment-related adverse events were closely monitored throughout the study and graded according to the National Cancer Institute Common Toxicity Criteria whenever they developed. In patients who had grade 3 or 4 adverse events, imatinib was either reduced by 100 mg or transiently stopped until the adverse event had resolved and reintroduced afterward at lower doses, respectively.

Blood tests including complete blood count and differential, routine biochemistry and sT were systematically performed before starting imatinib and at months +1, +2, +3, +6, +9 and +12 of therapy. Spleen and liver ultrasonography was performed in all cases before starting imatinib and, whenever organomegalies were detected, also at months +6 and +12 of therapy.

Both clinical evaluation and physical examination of patients were carried out by specialized medical doctors with expertise on mastocytosis (I.A-T, A.M and/or L.E) at months +3, +6, +9 and +12. Mastocytosis-related symptoms were evaluated in every patient by the same doctors using Likert-type scales obtained from

specific questionnaires designed by the REMA, by which MC-mediator release-associated symptoms (e.g. pruritus, flushing, abdominal cramping, diarrhea and anaphylaxis) were individually graded according to their frequency (0 = absent; 1 = less than monthly; 2 = monthly; 3 = weekly; 4 = daily or almost daily) and degree of severity (1 = no therapy required; 2 = kept under control with antiH1; 3 = corticosteroids required; 4 = epinephrine and/or hospitalization required). Individual scores per symptom were calculated for the 3 months preceding the start of imatinib, and then at months +3, +6, +9 and +12 of therapy, by multiplying their frequency and severity values (Figure 3).

To evaluate the cutaneous response, skin biopsies were performed before starting imatinib and at months +6 and +12 of therapy in all patients who presented with mastocytosis in the skin. To evaluate changes in BM MC infiltration, a complete BM study including histology, cytology and flow cytometry, was performed before starting imatinib and at month +12 of therapy; an additional BM study was performed at month +6 of therapy in those patients who had > 30% BM MC infiltration and/or advanced disease at the moment of starting therapy. For both cytologic and histologic studies, all specimens were independently reviewed by three experts (I.A-T, L.E and M.M). For the evaluation of MCs by flow cytometry, all BM samples were analyzed in parallel in two different laboratories of the REMA by two and three independent experts, respectively (JM.M and L.S-M, and A.M, C.C and C.T, respectively).

Endpoints and response criteria

The primary and secondary endpoints of the study were: 1) a change (e.g. decrease) in MC infiltration of involved organs including the BM and the skin, 2) a change (e.g. decrease) in the size of organomegalies (if present) as evaluated by abdominal ultrasonography, and 3) a change (e.g. decrease) in MC-mediator release-associated symptoms and sT levels. Complete response (CR) was defined as complete resolution of all disease signs and symptoms including BM MC infiltration, skin lesions, organomegalies and MC-mediator release-associated symptoms, plus a decrease in sT below normal values (< 11.5 µg/L). In turn, partial response (PR) was defined as ≥ 50% reduction in BM MC infiltration and improvement of skin lesions and/or organomegalies. All other patients were considered as non-responders (NR). Patients having outcomes other than CR, symptomatic response was evaluated as a separate endpoint using Likert-type scales obtained from specific questionnaires designed by the REMA.

All authors had access to clinical trial data and participated in data analysis, interpretation of results and writing, revision and final approval of the manuscript.

Abbreviations

ALT: Alanine Transaminase; ASM: Aggressive systemic mastocytosis; AST: Aspartate Transaminase; BM: Bone marrow; CEL: Chronic eosinophilic leukemia; CM: Cutaneous mastocytosis; CML: Chronic myeloid leukemia; CR: Complete response; DNA: Deoxyribonucleic acid; ECNM: European Competence Network on Mastocytosis; FACS: Fluorescence-activated cell sorting; FDA: Food and Drug Administration; FGFR1: Fibroblast Growth Factor Receptor 1; G-CSF: Granulocyte colony-stimulating factor; GIST: Gastrointestinal stromal tumor; HES: Hypereosinophilic syndrome; HIV: Human Immunodeficiency Virus; HUMARA: Human androgen receptor assay; ISM: Indolent systemic mastocytosis; IWG-MRT: International Working Group on Myeloproliferative Neoplasms Research and Treatment; JAK: Janus kinase; MC: Mast cell; MCL: Mast cell leukemia; NR: No response; NYHA: New York Heart Association; PB: Peripheral blood; PCR: Polymerase chain reaction; PDGFR: Platelet-derived growth factor receptor; PNA: Peptide nucleic acid; PR: Partial response; REMA: Spanish Network on Mastocytosis; SM: Systemic mastocytosis; SM-AHNMD: Systemic mastocytosis with an associated clonal haematological non-mast cell disease; SSM: Smoldering systemic mastocytosis; sT: Serum tryptase; TK: Tyrosine kinase; TKI: Tyrosine kinase inhibitor; WDSM: Well-differentiated systemic mastocytosis; WHO: World Health Organization.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no competing financial interest.

GRANT SUPPORT

This work was supported by grants from the Ministry of Health, Social Services and Equality, Madrid, Spain (grant EC11-287) (L.S-M), Fundación Mutua Madrileña (Madrid, Spain), Asociación Española de Enfermos de Mastocitosis (Madrid, Spain), Fundación Ramón Areces, Madrid, Spain (grant CIVP16A1806), Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer –RTICC– of the Instituto de Salud Carlos III, Ministry of Economy and Competitiveness, Madrid, Spain (grant RD12/0036/0048, FEDER) and Fundación Samuel Solorzano, Salamanca, Spain (grant FS/22-2014).

REFERENCES

1. Horny HP, Metcalfe DD, Bennet JM, Bain BJ, Akin C, Escribano L, Valent P, Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al. Mastocytosis. In: Swerdlow SH, et al. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: IARC. 2008; 54–63.

2. Escribano L, Orfao A, Villarrubia J, Díaz-Agustín B, Cerveró C, Ríos A, Velasco JL, Ciudad J, Navarro JL, San Miguel JF. Immunophenotypic characterization of human bone marrow mast cells. A flow cytometric study of normal and pathological bone marrow samples. *An Cell Pathol*. 1998; 16:151–159.
3. Escribano L, Díaz Agustín B, Bravo P, Navalón R, Almeida J, Orfao A. Immunophenotype of Bone Marrow Mast Cells in Indolent Systemic Mast Cell Disease in Adults. *Leuk Lymphoma*. 1999; 35:227–235.
4. Garcia-Montero AC, Jara-Acevedo M, Teodosio C, Sanchez ML, Nunez R, Prados A, Aldanondo I, Sanchez L, Dominguez M, Botana LM, Sanchez-Jimenez F, Sotlar K, Almeida J, et al. KIT mutation in mast cells and other bone marrow haematopoietic cell lineages in systemic mast cell disorders. A prospective study of the Spanish Network on Mastocytosis (REMA) in a series of 113 patients. *Blood*. 2006; 108:2366–2372.
5. Kristensen T, Vestergaard H, Bindslev-Jensen C, Møller M, Broesby-Olsen S. Sensitive KIT D816V mutation analysis of blood as a diagnostic test in mastocytosis. *Am J Hematol*. 2014; 89:493–498.
6. Jara-Acevedo M, Teodosio C, Sanchez-Munoz L, Alvarez-Twose I, Mayado A, Caldas C, Matito A, Morgado JM, Muñoz-Gonzalez JI, Escribano L, Garcia-Montero A, Orfao A. Detection of the KIT D816V mutation in peripheral blood of systemic mastocytosis: diagnostic implications. *Mod Pathol*. 2015; 28:1138–1149.
7. De Matteis G, Zanotti R, Colarossi S, De Benedittis C, Garcia-Montero A, Bonifacio M, Sartori M, Aprili F, Caruso B, Pavlati E, Carli G, Perbellini O, Zamò A, et al. The impact of sensitive KIT D816V detection on recognition of indolent Systemic Mastocytosis. *Leuk Res*. 2015; 39:273–278.
8. Longley BJ, Reguera MJ, Ma Y. Classes of c-KIT activating mutations: proposed mechanisms of action and implications for disease classification and therapy. *Leuk Res*. 2001; 25:571–576.
9. Furitsu T, Tsujimura T, Tono T, Ikeda H, Kitayama H, Koshimizu U, Sugahara H, Butterfield JH, Ashman LK, Kanayama Y, Matsuzawa Y, Kitamura Y, Kanakura Y. Identification of mutations in the coding sequence of the proto-oncogene c-kit in a human mast cell leukemia cell line causing ligand-independent activation of c-kit product. *J Clin Invest*. 1993; 92:1736–1744.
10. Akin C, Fumo G, Yavuz AS, Lipsky PE, Neckers L, Metcalfe DD. A novel form of mastocytosis associated with a transmembrane c-kit mutation and response to imatinib. *Blood*. 2004; 103:3222–3225.
11. Hartmann K, Wardelmann E, Ma YS, Merkelbach-Bruse S, Preussner LM, Woolery C, Baldus SE, Heinicke T, Thiele J, Buettner R, Longley BJ. Novel germline mutation of KIT associated with familial gastrointestinal stromal tumors and mastocytosis. *Gastroenterology*. 2005; 129:1042–1046.
12. Zhang LY, Smith ML, Schultheis B, Fitzgibbon J, Lister TA, Melo JV, Cross NC, Cavenagh JD. A novel K509I mutation of KIT identified in familial mastocytosis - *in vitro* and *in vivo* responsiveness to imatinib therapy. *Leuk Res*. 2006; 30:373–378.
13. Nakagomi N, Hirota S. Juxtamembrane-type c-kit gene mutation found in aggressive systemic mastocytosis induces imatinib-resistant constitutive KIT activation. *Lab Invest*. 2007; 87:365–371.
14. Chan EC, Bai Y, Kirshenbaum AS, Fischer ER, Simakova O, Bandara G, Scott LM, Wisch LB, Cantave D, Carter MC, Lewis JC, Noel P, Maric I, et al. Mastocytosis associated with a rare germline KIT K509I mutation displays a well-differentiated mast cell phenotype. *J Allergy Clin Immunol*. 2014; 134:178–187.
15. de Melo Campos P, Machado-Neto JA, Scopim-Ribeiro R, Visconte V, Tabarrok A, Duarte AS, Barra FF, Vassalo J, Rogers HJ, Lorand-Metze I, Tiu RV, Costa FF, Olalla Saad ST, et al. Familial systemic mastocytosis with germline KIT K509I mutation is sensitive to treatment with imatinib, dasatinib and PKC412. *Leuk Res*. 2014; 38:1245–1251.
16. Speight RA, Nicolle A, Needham SJ, Verrill MW, Bryon J, Panter S. Rare, germline mutation of KIT with imatinib-resistant multiple GI stromal tumors and mastocytosis. *J Clin Oncol*. 2013; 31:e245–e247.
17. Mital A, Piskorz A, Lewandowski K, Wasag B, Limon J, Hellmann A. A case of mast cell leukaemia with exon 9 KIT mutation and good response to imatinib. *Eur J Haematol*. 2011; 86:531–535.
18. Alvarez-Twose I, Gonzalez P, Morgado JM, Jara-Acevedo M, Sanchez-Munoz L, Matito A, Mollejo M, Orfao A, Escribano L. Complete Response After Imatinib Mesylate Therapy in a Patient With Well-Differentiated Systemic Mastocytosis. *J Clin Oncol*. 2012; 30:e126–129.
19. Alvarez-Twose I, Jara-Acevedo M, Morgado JM, Garcia-Montero A, Sánchez-Muñoz L, Teodósio C, Matito A, Mayado A, Caldas C, Mollejo M, Orfao A, Escribano L. Clinical, immunophenotypic, and molecular characteristics of well-differentiated systemic mastocytosis. *J Allergy Clin Immunol*. 2016; 137:168–178.
20. Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, Peng B, Buchdunger E, Ford JM, Lydon NB, Kantarjian H, Capdeville R, Ohno-Jones S, Sawyers CL. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2001; 344:1031–1037.
21. Demetri GD, von Mehren M, Blanke CD, Van den Abbeele AD, Eisenberg B, Roberts PJ, Heinrich MC, Tuveson DA, Singer S, Janicek M, Fletcher JA, Silverman SG, Silberman SL, et al. Efficacy and safety of imatinib mesylate in advanced gastrointestinal stromal tumors. *N Engl J Med*. 2002; 347:472–480.
22. Cortes J, Ault P, Koller C, Thomas D, Ferrajoli A, Wierda W, Rios MB, Letvak L, Kaled ES, Kantarjian H. Efficacy of imatinib mesylate in the treatment of idiopathic hypereosinophilic syndrome. *Blood*. 2003; 101:4714–4716.
23. Sanger F, Coulson AR. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol*. 1995; 94:441–448.

24. Hartmann K, Escribano L, Grattan C, Brockow K, Carter MC, Alvarez-Twose I, Matito A, Broesby-Olsen S, Siebenhaar F, Lange M, Niedoszytko M, Castells M, Oude Elberink JN, et al. Cutaneous manifestations in patients with mastocytosis: Consensus report of the European Competence Network on Mastocytosis; the American Academy of Allergy, Asthma & Immunology; and the European Academy of Allergology and Clinical Immunology. *J Allergy Clin Immunol*. 2016; 137:35–45.
25. Hauswirth AW, Simonitsch-Klupp I, Uffmann M, Koller E, Sperr WR, Lechner K, Valent P. Response to therapy with interferon alpha-2b and prednisolone in aggressive systemic mastocytosis: report of five cases and review of the literature. *Leuk Res*. 2004; 28:249–257.
26. Barete S, Lortholary O, Damaj G, Hirsch I, Chandesris MO, Elie C, Hamidou M, Durieu I, Suarez F, Grosbois B, Limal N, Gyan E, Larroche C, et al. Long-term efficacy and safety of cladribine (2-CdA) in adult patients with mastocytosis. *Blood*. 2015; 126:1009–1016.
27. Frost MJ, Ferrao PT, Hughes TP, Ashman LK. Juxtamembrane mutant V560GKit is more sensitive to Imatinib (STI571) compared with wild-type c-kit whereas the kinase domain mutant D816VKit is resistant. *Mol Cancer Ther*. 2002; 1:1115–1124.
28. Akin C, Brockow K, D'Ambrosio C, Kirshenbaum AS, Ma Y, Longley BJ and Metcalfe DD. Effects of tyrosine kinase inhibitor STI571 on human mast cells bearing wild-type or mutated c-kit. *Exp Hematol*. 2003; 31:686–692.
29. Ma YS, Zeng S, Metcalfe DD, Akin C, Dimitrijevic S, Butterfield JH, McMahon G, Longley BJ. The c-KIT mutation causing human mastocytosis is resistant to STI571 and other KIT kinase inhibitors; kinases with enzymatic site mutations show different inhibitor sensitivity profiles than wild-type kinases and those with regulatory-type mutations. *Blood*. 2009; 99:1741–1744.
30. Laine E, Chauvot de Beauchêne I, Perahia D, Auclair C, Tchertanov L. Mutation D816V alters the internal structure and dynamics of c-KIT receptor cytoplasmic region: implications for dimerization and activation mechanisms. *PLoS Comput Biol*. 2011; 7:e1002068.
31. Pottier P, Planchon B, Grossi O. Complete remission with imatinib mesylate (Glivec) of an idiopathic hypereosinophilic syndrome associated with a cutaneous mastocytosis after failure of interferon-alpha. *Rev Med Interne*. 2003; 24:542–546.
32. Pardanani A, Elliott M, Reeder T, Li CY, Baxter EJ, Cross NC, Tefferi A. Imatinib for systemic mast-cell disease. *Lancet*. 2003; 362:535–537.
33. Pardanani A, Ketterling RP, Brockman SR, Flynn HC, Paternoster SF, Shearer BM, Reeder TL, Li CY, Cross NC, Cools J, Gilliland DG, Dewald GW, Tefferi A. CHIC2 deletion, a surrogate for FIP1L1-PDGFR fusion, occurs in systemic mastocytosis associated with eosinophilia and predicts response to imatinib mesylate therapy. *Blood*. 2003; 102:3093–3096.
34. Elliott MA, Pardanani A, Li CY, Tefferi A. Immunophenotypic normalization of aberrant mast cells accompanies histological remission in imatinib-treated patients with eosinophilia-associated mastocytosis. *Leukemia*. 2004; 18:1027–1029.
35. Hennessy B, Giles F, Cortes J, O'Brien S, Ferrajoli A, Ossa G, Garcia-Manero G, Faderl S, Kantarjian H, Verstovsek S. Management of patients with systemic mastocytosis: Review of M. D. Anderson cancer center experience. *Am J Hematol*. 2004; 77:209–214.
36. Musto P, Falcone A, Sanpaolo G, Bodenizza C, Carella AM. Inefficacy of imatinib-mesylate in sporadic, aggressive systemic mastocytosis. *Leuk Res*. 2004; 28:421–422.
37. Pardanani A, Brockman SR, Paternoster SF, Flynn HC, Ketterling RP, Lasho TL, Ho CL, Li CY, Dewald GW, Tefferi A. FIP1L1-PDGFR fusion: Prevalence and clinicopathologic correlates in 89 consecutive patients with moderate to severe eosinophilia. *Blood*. 2004; 104:3038–3045.
38. Agis H, Sotlar K, Valent P, Horny HP. Ph-Chromosome-positive chronic myeloid leukemia with associated bone marrow mastocytosis. *Leuk Res*. 2005; 29:1227–1232.
39. Heinrich MC, Joensuu H, Demetri GD, Corless CL, Apperley J, Fletcher JA, Soulieres D, Dimhofer S, Harlow A, Town A, McKinley A, Supple SG, Seymour J, et al. Phase II, Open-Label Study Evaluating the Activity of Imatinib in Treating Life-Threatening Malignancies Known to Be Associated with Imatinib-Sensitive Tyrosine Kinases. *Clin Cancer Res*. 2008; 14:2717–2725.
40. Valent P, Akin C, Escribano L, Fodinger M, Hartmann K, Brockow K, Castells M, Sperr WR, Kluin-Nelemans HC, Hamdy NA, Lortholary O, Robyn J, van Doormaal J, et al. Standards and standardization in mastocytosis: consensus statements on diagnostics, treatment recommendations and response criteria. *Eur J Clin Invest*. 2007; 37:435–453.
41. Gotlib J, Pardanani A, Akin C, Reiter A, George T, Hermine O, Kluin-Nelemans H, Hartmann K, Sperr WR, Brockow K, Schwartz LB, Orfao A, Deangelo DJ, et al. International Working Group-Myeloproliferative Neoplasms Research and Treatment (IWG-MRT) & European Competence Network on Mastocytosis (ECNM) consensus response criteria in advanced systemic mastocytosis. *Blood*. 2013; 121:2393–2401.
42. Ryan RJ, Akin C, Castells M, Wills M, Selig MK, Nielsen GP, Ferry JA, Hornick JL. Mast cell sarcoma: a rare and potentially under-recognized diagnostic entity with specific therapeutic implications. *Mod Pathol*. 2013; 26:533–543.
43. Morren MA, Hoppe A, Renard M, Debiec Rychter M, Uytendaele A, Dubreuil P, Martin L. Imatinib mesylate in the treatment of diffuse cutaneous mastocytosis. *J Pediatr*. 2013; 162:205–207.
44. Hoffmann KM, Moser A, Lohse P, Winkler A, Binder B, Sovinz P, Lackner H, Schwinger W, Benesch M, Urban C. Successful treatment of progressive cutaneous mastocytosis

- with imatinib in a 2-year-old boy carrying a somatic KIT mutation. *Blood*. 2008; 112:1655–1657.
45. Droogendijk HJ, Kluin-Nelemans HJ, Van Doormaal JJ, Oranje AP, van de Loosdrecht AA, van Daele PL. Imatinib mesylate in the treatment of systemic mastocytosis: a phase II trial. *Cancer*. 2006; 107:345–351.
 46. Florian S, Esterbauer H, Binder T, Müllauer L, Haas OA, Sperr WR, Sillaber C, Valent P. Systemic mastocytosis (SM) associated with chronic eosinophilic leukemia (SM-CEL): detection of FIP1L1/PDGFRA α , classification by WHO criteria, and response to therapy with imatinib. *Leuk Res*. 2006; 30:1201–1205.
 47. Merante S, Chichino G, Boveri E, Gottardi E, Soverini S, Cillonì D, Martinelli G. First case of an AIDS patient with systemic mast cell disease associated with FIP1-positive eosinophilia treated with imatinib mesylate therapy. *J Clin Oncol*. 2006; 24:e6–e7.
 48. Koenig M, Morel J, Reynaud J, Varvat C, Cathebras P. An unusual cause of spontaneous bleeding in the intensive care unit - mastocytosis: a case report. *Cases J*. 2008; 1:100.
 49. Pagano L, Valentini CG, Caira M, Rondoni M, Van Lint MT, Candoni A, Allione B, Cattaneo C, Marbello L, Caramatti C, Pogliani EM, Iannitto E, Giona F, et al. Advanced mast cell disease: an Italian Hematological Multicenter experience. *Int J Hematol*. 2008; 88:483–488.
 50. Valentini CG, Rondoni M, Pogliani EM, Van Lint MT, Cattaneo C, Marbello L, Pulsoni A, Giona F, Martinelli G, Leone G, Pagano L. Mast cell leukemia: a report of ten cases. *Ann Hematol*. 2008; 87:505–508.
 51. Vega-Ruiz A, Cortes JE, Sever M, Manshoury T, Quintás-Cardama A, Luthra R, Kantarjian HM, Verstovsek S. Phase II study of imatinib mesylate as therapy for patients with systemic mastocytosis. *Leuk Res*. 2009; 33:1481–1484.
 52. Jung AG, Horny HP, Sotlar K, Overbeck T, Schön MP, Lippert U. Imatinib mesylate for aggressive systemic mastocytosis with long bone osteolysis. *J Am Acad Dermatol*. 2011; 65:224–226.
 53. Ma HB, Xu X, Liu WP, Chang H, Zeng F, Wang YC. Successful treatment of mast cell sarcoma of the uterus with imatinib. *Int J Hematol*. 2011; 94:491–494.
 54. Agarwala MK, George R, Mathews V, Balasubramanian P, Thomas M, Nair S. Role of imatinib in the treatment of pediatric onset indolent systemic mastocytosis: a case report. *J Dermatolog Treat*. 2013; 24:481–483.
 55. Vannorsdall EJ, Collins JA, Chen QC, Sarai G, Baer MR. Symptomatic response to imatinib mesylate in cutaneous mastocytosis associated with chronic myelomonocytic leukemia. *Curr Oncol*. 2013; 20:e349–e353.
 56. Valent P, Cerny-Reiterer S, Hoermann G, Sperr WR, Müllauer L, Mannhalter C, Pehamberger H. Long-lasting complete response to imatinib in a patient with systemic mastocytosis exhibiting wild type KIT. *Am J Blood Res*. 2014; 4:93–100.
 57. Marton I, Posfai E, Borbenyi Z, Bödör C, Papp G, Demeter J, Korom I, Varga E, Bata-Csörgő Z, et al. Therapeutic challenge during the long-term follow-up of a patient with indolent systemic mastocytosis with extensive cutaneous involvement. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2015; 19:1607–1609.
 58. Auquit-Auckbur I, Lazar C, Deneuve S, Guillemet C, Cordel N, Blanchard F, Joly P, Courville P. Malignant transformation of mastocytoma developed on skin mastocytosis into cutaneous mast cell sarcoma. *Am J Surg Pathol*. 2012; 36:779–782.
 59. Sakane-Ishikawa E, Kodaka T, Tsunemine H, Itoh K, Akasaka H, Kusama T, Imaizumi K, Taketomi M, Sada A, Katayama Y, Itoh T, Takahashi T. Eosinophilia and bone lesion as clinical manifestations of aggressive systemic mastocytosis. *J Clin Exp Hematop*. 2013; 53:207–213.
 60. Iliakis T, Rougkala N, Diamantopoulos PT, Papadopoulou V, Kalala F, Zervakis K, Giannakopoulou N, Chatzinikolaou P, Levidou G, Lakiotaki E, Korkolopoulou P, Patsouris E, Variami E, et al. An adult patient with systemic mastocytosis and B-acute lymphoblastic leukemia. *Case Rep Med*. 2014; 2014:526129.
 61. Savini P, Rondoni M, Poletti G, Lanzi A, Quercia O, Soverini S, De Benedittis C, Musardo G, Martinelli G, Stefanini GF. Serum total tryptase level confirms itself as a more reliable marker of mast cells burden in mast cell leukaemia (aleukaemic variant). *Case Rep Hematol*. 2015; 2015:737302.
 62. Lahortiga I, Akin C, Cools J, Wilson TM, Mentens N, Arthur DC, Maric I, Noel P, Kocabas C, Marynen P, Lessin LS, Wlodarska I, Robyn J, et al. Activity of imatinib in systemic mastocytosis with chronic basophilic leukemia and a PRKG2-PDGFRB fusion. *Haematologica*. 2008; 93:49–56.
 63. Dalal BI, Horsman DE, Bruyere H, Forrest DL. Imatinib mesylate responsiveness in aggressive systemic mastocytosis: Novel association with a platelet derived growth factor receptor beta mutation. *Am J Hematol*. 2007; 82:77–79.
 64. Gollard RP, Ruemmler-Fish C, Garcia D. Systemic Mastocytosis: documented pathologic response to imatinib. *Eur J Haematol*. 2007; 79:367–368.
 65. Kupfer SS, Hart J, Mohanty SR. Aggressive systemic mastocytosis presenting with hepatic cholestasis. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2007; 19:901–905.
 66. Yoshida C, Takeuchi M, Tsuchiyama J, Sadahira Y. Successful treatment of KIT D816V-positive, imatinib-resistant systemic mastocytosis with interferon- α . *Intern Med*. 2009; 48:1973–1978.
 67. Moore AE, Johnston WH, Hever A, Peng S, Kujubu DA. Systemic mastocytosis presenting with acute oliguric renal failure: report of a case and review of the literature. *Int Urol Nephrol*. 2012; 44:639–642.

3.3.4. COMPLETE RESPONSE TO GEMTUZUMAB OZOGAMICIN IN A PATIENT WITH REFRACTORY MAST CELL LEUKEMIA.

Iván Álvarez-Twose, Pilar Martínez-Barranco, Jason Gotlib, Andrés García-Montero, José Mário Morgado, María Jara-Acevedo, Jason D. Merker, Francisco Javier Peñalver, Almudena Matito, Yanli Hou, Laura Sánchez-Muñoz, Andrea Mayado, Manuela Mollejo, Luis Escribano y Alberto Orfao.

Leukemia 2016;30(8):1753-1756.

Complete response to gemtuzumab ozogamicin in a patient with refractory mast cell leukemia

Leukemia (2016) **30**, 1753–1756; doi:10.1038/leu.2016.30

Mast cell (MC) leukemia (MCL) is a subtype of systemic mastocytosis (SM) defined by the World Health Organization as $\geq 20\%$ of MCs in the bone marrow (BM) aspirate, with (leukemic variant) or without (aleukemic variant) $\geq 10\%$ of MCs in peripheral blood (PB).^{1–3} The European/American Consensus Group on Mastocytosis has recently proposed a new subclassification of MCL that distinguishes acute vs chronic MCL based on the presence vs absence of organ damage, respectively.³ Patients with chronic MCL appear to have lower proliferation rates with a less aggressive disease course than patients with acute MCL. Despite this, except for a few patients who have shown dramatic response to imatinib,⁴ midostaurin,⁵ or hematopoietic stem cell transplantation (HSCT),⁶ most MCL patients show progressive disease with survival rates usually < 6 months. Here, we report the first case of MCL successfully treated with gemtuzumab ozogamicin (GO) after failure of multiple previous therapies.

The patient was a 69-year-old woman who was referred to our Mastocytosis Reference Center (CLMast, Toledo, Spain) in February 2011 due to a 9-year history of a solitary mastocytoma of her right arm associated with recurrent anaphylaxis. Because anaphylactic episodes were often triggered by accidental friction of the mastocytoma, it was surgically removed 1 year before referral. However, after surgery the patient still had frequent MC mediator release episodes requiring multiple (> 20) visits to the emergency room despite daily treatment with oral cromolyn, H1 and H2 blockers, and montelukast. At referral, serum tryptase (sT) was 196 $\mu\text{g/l}$ (normal, $< 11.5 \mu\text{g/l}$) and the PB showed hemoglobin 11.4 g/dl (Figure 1). Routine biochemistries and physical examination were unremarkable. BM aspirate smears and biopsy revealed marked infiltration (65% of BM cellularity) by MCs (Figures 1 and 2) that accounted for 14% of all BM-nucleated cells in the aspirated sample assessed by flow cytometry (Figures 1 and 2), with an aberrant CD45⁺ CD117⁺⁺ CD34[–] CD2^{low} CD25[–] CD33⁺⁺ CD30[–] and cyCPA⁺⁺ immunophenotype; in contrast, these cells were absent in the PB. No cytomorphologic or immunophenotypic abnormalities were detected in other BM hematopoietic cells. Neither the *KIT* D816V mutation nor other mutations in *KIT* exons 2, 8, 9, 10, 11 and 17 were identified, and fluorescence *in situ* hybridization analysis of BM cells showed no evidence of deletions of chromosomes 5q31, 7q31, 20q12 or trisomy 8. Genome sequencing performed on DNA from fluorescence-activated cell sorting-purified BM MCs identified 20 single-nucleotide variants (SNVs)/Mb genome wide, mostly corresponding to TC \rightarrow TT nucleotide changes.

On the basis of the above findings, the patient was diagnosed with *KIT*-negative aleukemic MCL with no associated non-MC hematological neoplasm and she was included in a clinical trial with imatinib (clinicaltrials.gov identifier NCT01297777) without response after 6 months of therapy (Figure 1). Over the following 2 years, sequential treatments with subcutaneous pegylated (PEG)-interferon α -2b (50 $\mu\text{g/week}$), PEG-interferon combined with low-dose hydroxyurea (that is, 3 g/week, orally) and the multi-kinase/*KIT* inhibitor midostaurin (100 mg twice a day, orally) were administered. In this period, the percentage of MCs in BM smears ranged between 75 and 85% during PEG-interferon therapy, decreased to 50% within the first 6 months of midostaurin and

increased to 90% 6 months later; in parallel, although flow cytometry studies revealed lower percentages of BM MC counts, they showed proportional changes throughout these same time checkpoints (Figure 1). At this time, the patient developed right axillary lymphadenopathy with massive MC infiltration of the lymph nodes; consequently, she was placed on monthly cycles of cladribine (0.14 mg/kg per day intravenously (i.v.) for 5 days). Because no response was observed after three cycles, midostaurin was reintroduced as combination therapy, but at 50% doses to minimize potential side effects, which resulted in only modest improvement of symptoms without significant changes in sT levels (Figure 1). Indeed, the patient began to require red blood cell and platelet transfusions on a regular basis (Figure 1), which prompted discontinuation of both drugs in August 2014. Two months later, compassionate use GO was initiated based on high levels of CD33 expression on the patient MCs and previous data showing the inhibitory activity of GO against neoplastic MCs *in vitro*.⁷ The patient was given a single dose of GO (6 mg/m² i.v.) with i.v. dexchlorpheniramine, ranitidine, acetaminophen and methylprednisolone as premedications. The GO infusion was well tolerated; however, on day +3, the patient underwent urgent laparotomy to repair a duodenal perforation. On day +7, the patient developed grade 4 neutropenia without infection; however, 5 days after neutrophil recovery (day +16), she developed a fever related to a surgical wound infection that resolved with carbapenem. Three weeks after the first course of GO, the patient was given a second course (3 mg/m² i.v.) under the same premedication protocol (Figure 1), which was well tolerated. On day +10, she developed febrile neutropenia that was successfully managed again with empiric carbapenem.

Two months after the start of GO therapy, the sT level normalized that was accompanied by improvement in cytopenias and, ultimately, transfusion independence (Figure 1). Four months after the last course of GO, BM showed a complete remission with only occasional small clusters of MCs that represented $< 1\%$ of all BM-nucleated cells by cytology and flow cytometry (Figures 1 and 2). Except for a single episode of flushing and hypotension developed in the context of surgical wound infection on day +16 after the first course of GO, the patient has remained free of MC mediator release symptoms since the initiation of treatment, permitting tapering of anti-mediator therapy. This was consistent with an early complete regression of MC mediator symptoms according to previously reported consensus criteria.⁸ In addition, liver enzyme tests, including alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, gamma-glutamyl transpeptidase and serum alkaline phosphatase, showed normal levels before initiation of GO and remained within normal values thereafter. At last follow-up (7 months after the last GO dose), the patient still remained in complete remission with sT $< 20 \mu\text{g/l}$, stable blood counts and transfusion independence (Figure 1).

GO is a chalcone derivative cytotoxic antibiotic conjugated to a humanized anti-CD33 monoclonal antibody, which has been previously used to treat CD33⁺ acute myeloid leukemia (AML) patients. After binding to the CD33 antigen on tumor cells, CD33/GO complexes are internalized into lysosomes, where chalcone is released causing DNA double-strands breaks and apoptosis. Studies on AML models have shown that upon internalization of CD33/GO complexes, new CD33 molecules are rapidly expressed on the surface of the targeted cells providing new sites for GO binding,⁹ which results in accumulation of

Accepted article preview online 15 February 2016; advance online publication, 4 March 2016

© 2016 Macmillan Publishers Limited

Leukemia (2016) 1742–1792

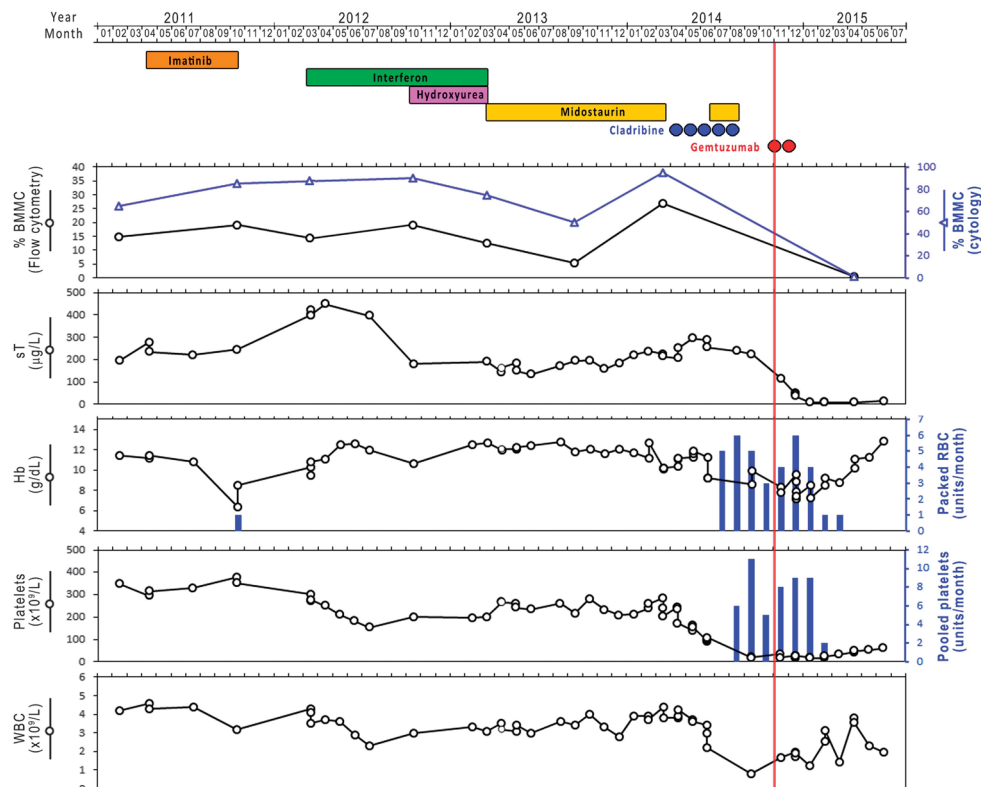


Figure 1. Effect of the different cytreoreductive agents administered to the MCL patient (from initial diagnosis to the last follow-up visit) on the percentage of BM MCs by cytology and flow cytometry, sT levels, peripheral blood counts and transfusion requirements. The vertical red line indicates the start of GO therapy. Note that discrepant MC counts by cytology and flow cytometry have been previously reported in the literature in line with what was also observed in this patient.⁴

intracellular GO as long as saturating drug levels had been administered. CD33 is expressed on early committed myelomonocytic precursor, but not on hematopoietic stem cells. During myeloid differentiation, CD33 is downregulated on mature neutrophils, whereas strong CD33 expression is retained by monocytes. In turn, MCs display high levels of expression of CD33 on their surface membrane regardless of their maturation stage.¹⁰ Previous studies have shown that GO inhibits the growth, and induces apoptosis of normal and neoplastic MCs *in vitro*.⁷

A major concern when using GO at standard doses (that is, 9 mg/m² on days 1 and 15) in AML patients is the potential development of liver veno-occlusive disease, particularly in the HSCT settings. Several clinical studies indicated that treatment schedules using lower GO doses might have a similar efficacy with a better safety profile.¹¹ Thus, our patient was treated on a condensed GO protocol consisting of 6 mg/m² on day 1 and 3 mg/m² on day 21. With this approach and use of premedications, GO was well tolerated with neither infusion-related symptoms nor liver dysfunctions. Duodenal perforation occurring after the first drug dose has not been reported so far in the context of GO therapy and was likely related with long-term

corticosteroid therapy in association with worsening of preexisting thrombocytopenia.

There is only one case reported in which GO therapy (in combination with a cytarabine-based induction regimen) was given to a child diagnosed with SM associated with AML who achieved CR of both disease entities after treatment.¹² Despite in our patient, the BM could not be analyzed prior GO therapy, there were no significant changes in sT levels during the 5 months of previous treatment with cladribine ± midostaurin; this, together with the rapid decrease of sT immediately after initiating GO, strongly suggests that the marked decrease of BM MC infiltration was more likely due to the effect of GO than of cytreoreductive drugs administered earlier. It should be noted that the overall response to GO therapy achieved by our patient was consistent with a complete remission according to the available response criteria for advanced mastocytosis, defined by disappearance of BM MC infiltrates, decrease of sT levels < 20 µg/L and improvement of cytopenias,^{8,13,14} although transfusion independency could be also influenced by the cessation of the myelosuppressant effect of prior treatment with cladribine and midostaurin, the strength of the response is enhanced by the fact that the number

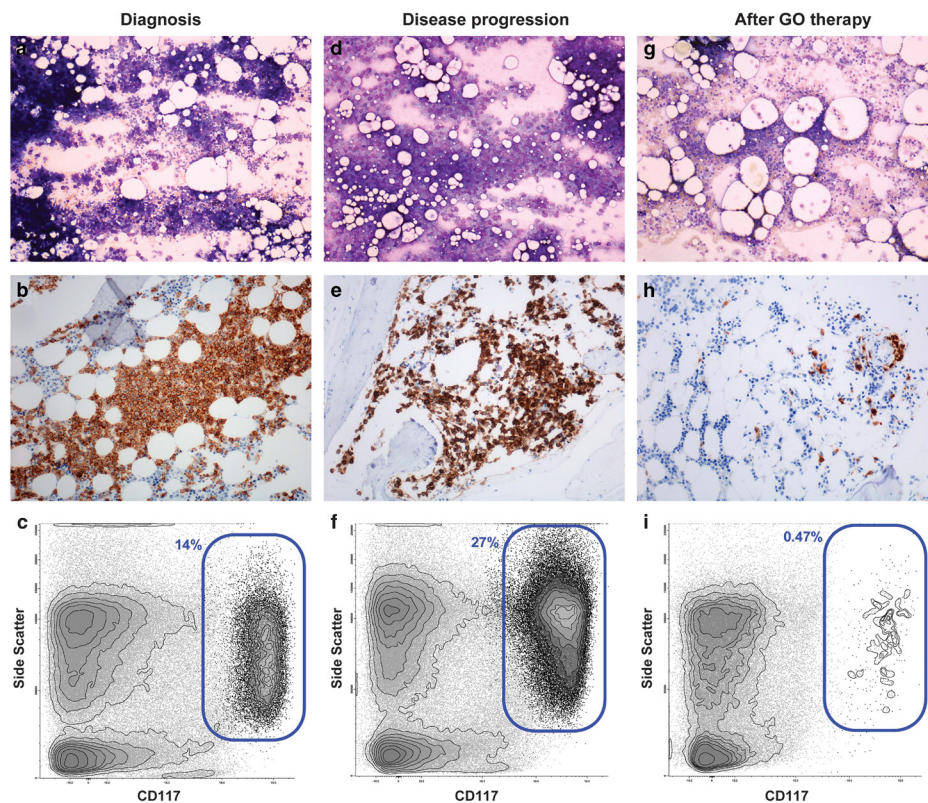


Figure 2. BM findings at diagnosis, disease progression and after GO therapy. BM smears (May-Grünwald-Giemsa stain, 100 \times magnification) and sections (c-kit stain, 100 \times magnification) showed extensive infiltration by round, fully granulated MCs at diagnosis (**a**, **b**) and at disease progression after midostaurin therapy (**d**, **e**), which accounted for 14% (**c**) and 27% (**f**), respectively, of all BM-nucleated cells by flow cytometry. A BM specimen obtained 6 months after initiation of GO therapy revealed marked reduction in BM MC infiltration (**g**), MGG-stained BM aspirate smear, 100 \times magnification; (**h**), c-kit-stained BM section, 100 \times magnification), which represented 0.47% of all BM-nucleated cells by flow cytometry (**i**).

of somatic SNVs identified in the patient was substantially greater vs those typically observed in other hematologic neoplasms (for example, AML, median < 0.4/Mb),¹⁵ which translates into a profound alteration of the mastopoiesis in this MCL patient.

In summary, here we provide the first evidence that GO has marked and sustained single-agent activity in refractory/relapsed *KIT*-negative MCL with no associated non-MC hematological disorder, which paves the way for the development of future clinical trials with GO in MCL patients and also in other forms of advanced SM to explore its potential benefit in these poor prognosis patients.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from Fundación Mutua Madrileña (Madrid, Spain), Asociación Española de Enfermos de Mastocitosis (Madrid, Spain), Fundación Ramón Areces, Madrid, Spain (grant C1P16A1806), Red Temática de Investigación Cooperativa en

Cancer (RTICC) of the Instituto de Salud Carlos III, Ministry of Economy and Competitiveness, Madrid, Spain (grant RD12/0036/0048, FEDER), Fundación Samuel Solorzano, Salamanca, Spain (grant FS/22-2014), and the Charles and Ann Johnson Foundation.

I Alvarez-Twose¹, P Martínez-Barranco², J Gotlib³, A García-Montero⁴, JM Morgado¹, M Jara-Acevedo⁴, JD Merker⁵, FJ Peñalver², A Matito¹, Y Hou², L Sánchez-Muñoz¹, A Mayado⁴, M Mollejo⁶, L Escribano⁴ and A Orfao⁴

¹Instituto de Estudios de Mastocitosis de Castilla La Mancha (CLMast), Hospital Virgen del Valle, Toledo, Spain;

²Hematology Unit, Hospital Universitario Fundación Alcorcón, Madrid, Spain;

³Division of Hematology, Department of Medicine, Stanford University School of Medical/Stanford Cancer Institute, Stanford, CA, USA;

⁴Servicio General de Citometría (NUCLEUS), Centro de Investigación del Cáncer (IBMCC-CSIC/USAL and IBSAL) and Departamento de Medicina, Universidad de Salamanca, Salamanca, Spain;

⁵Department of Pathology, Stanford University School of Medicine, Stanford, CA, USA and



⁶Department of Pathology, Hospital Virgen de la Salud, Toledo, Spain
E-mail: ivana@sescam.jccm.es

REFERENCES

- 1 Valent P, Horny H-P, Li CY, Longley JB, Metcalfe DD, Parwaresch RM *et al.* Mastocytosis. In: Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW (eds). *World Health Organization (WHO) Classification of Tumours*, vol. 1. IARC Press: Lyon, France, 2001, pp 291–302.
- 2 Valent P, Horny HP, Escribano L, Longley BJ, Li CY, Schwartz LB *et al.* Diagnostic criteria and classification of mastocytosis: a consensus proposal. *Leuk Res* 2001; **25**: 603–625.
- 3 Valent P, Sotlar K, Sperr WR, Escribano L, Yavuz S, Reiter A *et al.* Refined diagnostic criteria and classification of mast cell leukemia (MCL) and myelomastocytic leukemia (MML): a consensus proposal. *Ann Oncol* 2014; **25**: 1691–1700.
- 4 Mital A, Piskorz A, Lewandowski K, Wasag B, Limon J, Hellmann A. A case of mast cell leukaemia with exon 9 KIT mutation and good response to imatinib. *Eur J Haematol* 2011; **86**: 531–535.
- 5 Gotlib J, Kluin-Nelemans HC, George TI, Akin C, Sotar K, Hermine O *et al.* Midostaurin (PKC412) Demonstrates a High Rate of Durable Responses in Patients with Advanced Systemic Mastocytosis: Results from the Fully Accrued Global Phase 2 CPKC412D2201 Trial. *Blood* 2014; **124**: 636.
- 6 Ustun C, Reiter A, Scott BL, Nakamura R, Damaj G, Kreil S *et al.* Hematopoietic stem-cell transplantation for advanced systemic mastocytosis. *J Clin Oncol* 2014; **32**: 3264–3274.
- 7 Krauth MT, Bohm A, Agis H, Sonneck K, Samorapoompichit P, Florian S *et al.* Effects of the CD33-targeted drug gemtuzumab ozogamicin (Mylotarg) on growth and mediator secretion in human mast cells and blood basophils. *Exp Hematol* 2007; **35**: 108–116.
- 8 Valent P, Akin C, Escribano L, Födinger M, Hatmann K, Brockow K *et al.* Standards and standardization in mastocytosis: consensus statements on diagnostics, treatment recommendations and response criteria. *Eur J Clin Invest* 2007; **37**: 435–453.
- 9 van Der Velden VH, Te Marvelde JG, Hoogeveen PG, Bernstein ID, Houtsmuller AB, Berger MS *et al.* Targeting of the CD33-calicheamicin immunoconjugate Mylotarg (CMA-676) in acute myeloid leukemia: in vivo and in vitro saturation and internalization by leukemic and normal myeloid cells. *Blood* 2001; **97**: 3197–3204.
- 10 Orfao A, Escribano L, Villarrubia J, Velasco JL, Cerveró C, Ciudad J *et al.* Flow cytometric analysis of mast cells from normal and pathological human bone marrow samples. Identification and enumeration. *Am J Pathol* 1996; **149**: 1493–1499.
- 11 Amadori S, Suciu S, Selleslag D, Stasi R, Alimena G, Baila L *et al.* Randomized trial of two schedules of low-dose gemtuzumab ozogamicin as induction monotherapy for newly diagnosed acute myeloid leukaemia in older patients not considered candidates for intensive chemotherapy. A phase II study of the EORTC and GIMEMA leukaemia groups (AML-19). *Br J Haematol* 2010; **149**: 376–382.
- 12 Jeong DK, Fauman K, Ross C, Akin C, Mody R. Successful treatment of systemic mastocytosis associated with AML-M2, t (8; 21) in a child using MRC-based AML chemotherapy along with gemtuzumab. *J Allergy Clin Immunol* 2007; **119**(Suppl 1): S207 (abstract 814).
- 13 Valent P, Akin C, Sperr WR, Escribano L, Arock M, Horny HP *et al.* Aggressive systemic mastocytosis and related mast cell disorders: current treatment options and proposed response criteria. *Leuk Res* 2003; **27**: 635–641.
- 14 Gotlib J, Pardanani A, Akin C, Reiter A, George T, Hermine O *et al.* International Working Group-Myeloproliferative Neoplasms Research and Treatment (IWG-MRT) & European Competence Network on Mastocytosis (ECNM) consensus response criteria in advanced systemic mastocytosis. *Blood* 2013; **121**: 2393–2401.
- 15 Cancer Genome Atlas Research Network. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2013; **368**: 2059–2074.

4. CAPÍTULO CUARTO

DISCUSIÓN

Bajo el término mastocitosis se engloba un amplio espectro de enfermedades con una extraordinaria heterogeneidad, cuyo diagnóstico se basa en la demostración de MCs patológicos en diversos órganos y tejidos. Desde que en 1887 Paul Unna describiera por primera vez la presencia de MCs en las lesiones cutáneas de pacientes con UP (467), la evaluación histomorfológica de la piel y otros tejidos ha constituido la piedra angular del diagnóstico de la mastocitosis. No obstante, no fue hasta finales del siglo XX cuando se estableció la relación existente entre la mastocitosis tisular y niveles elevados de triptasa en sangre (117), la presencia de inmunofenotipos aberrantes en los MCs patológicos (468) y el descubrimiento de la mutación D816V de *KIT* como marcador genético altamente característico de la enfermedad (182). Todo ello ha permitido la incorporación de nuevos métodos diagnósticos en el estudio de la mastocitosis, lo cual a su vez ha supuesto el punto de partida para los grandes avances que se han producido durante los últimos años en el conocimiento de la enfermedad. A modo de ejemplo, la existencia de un parámetro bioquímico fácilmente medible en suero como es la triptasa, posibilita el diagnóstico de sospecha en aquellos casos de mastocitosis sin afectación cutánea, que de otra manera podrían pasar desapercibidos (229). De igual modo, la incorporación de la citometría de flujo multiparamétrica al estudio de la MO de pacientes con mastocitosis ha permitido la identificación de MCs patológicos con alta sensibilidad y especificidad, así como su cuantificación precisa, incluso en aquellos casos que presentan una baja carga mastocitaria, en ausencia de agregados de MCs en MO mediante técnicas de inmunohistoquímica (50,468,469). Por otro lado, el descubrimiento de la presencia de mutaciones en el gen *KIT* en la gran mayoría de pacientes con mastocitosis ha supuesto, además de su indiscutible valor diagnóstico como marcador genético de la enfermedad, el inicio de una nueva era en lo referente al desarrollo de terapias dirigidas.

La integración de todas estas nuevas herramientas diagnósticas junto a la evaluación de las características clínicas y biológicas de la enfermedad dieron lugar en el año 2001 al establecimiento de criterios diagnósticos bien definidos (294,295) que constituyen el pilar básico en el que se apoya la clasificación actual de la mastocitosis (165,166). En esta clasificación se distinguen nueve variantes clínicas de mastocitosis en función del tipo de

tejido afectado, la extensión de la afectación, la presencia o no de signos de disfunción orgánica y la presencia o no de otras enfermedades hematológicas (clonales) concomitantes. Una de las aportaciones más relevantes de esta clasificación es la correlación significativa que existe entre determinados subtipos de mastocitosis y el pronóstico de la enfermedad en términos de supervivencia global; así, mientras que la CM y la ISM son formas de buen pronóstico asociadas a una supervivencia a largo plazo similar a la de la población general, cuyo tratamiento se centra en el manejo sintomático de la enfermedad, la ASM, la MCL, la SM-AHNMD y el MCS constituyen formas avanzadas de la enfermedad que requieren de la adopción de medidas terapéuticas dirigidas a reducir la carga mastocitaria y/o el componente tumoral de la hemopatía clonal asociada, en el caso de la SM-AHNMD.

A pesar de la utilidad incuestionable de los criterios diagnósticos y de la clasificación actual de la OMS para identificar grupos pronósticos de mastocitosis con un impacto directo en la toma de decisiones terapéuticas, debe reconocerse también que dicha clasificación presenta algunas limitaciones. Así, la clasificación actual de la OMS no permite identificar aquellos pacientes pertenecientes *a priori* al grupo de mastocitosis de buen pronóstico, fundamentalmente pacientes con ISM, que con el tiempo progresan a una forma o variante de mal pronóstico. Este tipo de comportamiento de la enfermedad no puede ser explicado por la mera presencia de la mutación de *KIT*, puesto que ésta está presente en la inmensa mayoría de pacientes con SM, independientemente del subtipo diagnóstico concreto al que pertenecen (176–179). Aunque es poco frecuente, la progresión de ISM a formas avanzadas de mastocitosis (p. ej., ASM, MCL o SM-AHNMD) supone un cambio en el pronóstico vital del paciente, por lo que resulta de extrema importancia la identificación de factores que puedan conferir un riesgo de progresión de la enfermedad y faciliten la selección de aquellos pacientes con ISM que se beneficiarían de un seguimiento más estrecho, para la adopción precoz de estrategias terapéuticas citorreductoras que ayuden a prevenir la progresión maligna.

Estudios recientes han puesto de manifiesto la presencia de mutaciones en genes diferentes de *KIT* en la mayoría de pacientes con formas avanzadas de mastocitosis y la asociación entre algunas de estas mutaciones y una menor supervivencia de la enferme-

dad (311,358). Estos hallazgos sugieren que la adquisición de estas nuevas alteraciones genéticas probablemente represente el evento biológico necesario para que se produzca la marcada expansión tumoral que caracteriza a las formas avanzadas de mastocitosis. Sin embargo, por el momento sigue sin identificarse el factor (o factores) que podrían favorecer la adquisición de dichas mutaciones.

Otra de las limitaciones de los criterios diagnósticos actuales de la OMS para mastocitosis está relacionada con la falta de definición de los requerimientos mínimos de sensibilidad que deben poseer las diferentes técnicas a aplicar para establecer cada uno de los criterios diagnósticos, especialmente en el caso de pacientes con ISM que presentan una baja carga mastocitaria. En estos casos es habitual la ausencia de agregados de MCs en MO por inmunohistoquímica (criterio mayor) asociada a niveles de triptasa sérica $<20 \mu\text{g/L}$ (uno de los criterios diagnósticos menores de SM). En este escenario, resulta crucial el análisis de los demás criterios menores (citológico, inmunofenotípico y molecular) utilizando técnicas diagnósticas suficientemente sensibles como para detectar las alteraciones propias de los MCs patológicos de MO en una población celular minoritaria, en frecuencia similar a lo que ocurre con otras hemopatías en niveles de enfermedad mínima residual. En este sentido, tanto el empleo de la citometría de flujo multiparamétrica de alta sensibilidad como la purificación de MCs de MO de forma previa al análisis molecular de las mutaciones de *KIT* mediante la técnica de PNA-PCR y de ASOqPCR para la identificación específica de la mutación D816V, han adquirido especial relevancia en el diagnóstico de mastocitosis por su elevada sensibilidad. Precisamente, esta última técnica molecular ha permitido incrementar la frecuencia con la que se detecta la mutación D816V de *KIT* en muestras de sangre periférica de pacientes con ISM y mutación de *KIT* restringida a MCs. Además, debido a su naturaleza cuantitativa y su elevada sensibilidad, este método constituye una herramienta potencialmente útil para la monitorización de enfermedad residual en pacientes con mastocitosis tras la administración de tratamientos citorreductores (177–179).

En paralelo, en los últimos años se han identificado nuevas formas de mastocitosis con características clínicas y/o biológicas únicas que las diferencian de las formas típicas

(clásicas) de la enfermedad. La más frecuente de entre estas nuevas variantes de mastocitosis es la denominada ISMs-, caracterizada por la presencia de síntomas relacionados con la liberación de mediadores mastocitarios en ausencia de afectación cutánea. Actualmente existe consenso en que la mera presencia de lesiones cutáneas compatibles con mastocitosis en adultos debe hacer sospechar la existencia de una SM, y constituye por tanto, una indicación para la realización de un estudio de MO a todos aquellos pacientes que las presentan (175,470). En cambio, la sospecha de SM puede pasar desapercibida en aquellos pacientes que debutan con manifestaciones clínicas sugestivas de liberación de mediadores mastocitarios en ausencia de afectación cutánea, debido a la falta de especificidad de los síntomas que habitualmente presentan y que pueden ser indistinguibles de los observados en reacciones alérgicas. De hecho, la detección de anticuerpos de tipo IgE frente a un determinado antígeno que define a los procesos alérgicos, se observa en idéntica proporción entre los pacientes con mastocitosis y la población general (243), lo cual puede dificultar, aún más si cabe, la sospecha de una mastocitosis subyacente en el contexto de una reacción de tipo alérgico.

Otra variante mucho más rara de mastocitosis descrita en los últimos años es la denominada WDSM. Esta variante de SM fue definida en el año 2004 en una paciente con ASM cuyos MCs de MO presentaban características morfológicas y fenotípicas propias de MCs maduros (bien diferenciados) asociadas a una mutación germinal de *KIT* diferente de la mutación D816V, localizada en el dominio transmembrana de la molécula y que resultó ser sensible al tratamiento con imatinib (199). Desde la primera descripción de la WDSM, tan solo se han descrito casos aislados de esta nueva variante de mastocitosis, habitualmente asociados a una elevada carga mastocitaria al diagnóstico y una historia previa de larga duración (197,198), sugiriendo que puedan tratarse en su inicio de variantes indolentes de la enfermedad con tendencia a progresar con el tiempo. De forma similar a lo que ocurre con la ISMs-, la principal limitación para la correcta identificación de este subtipo de mastocitosis es que su carácter sistémico puede pasar fácilmente inadvertido, al menos en las fases iniciales de la enfermedad en las que no existe todavía un incremento significativo en los niveles de triptasa sérica, con el agravante de que los criterios menores

citológico y fenotípico de SM están sistemáticamente ausentes por definición. En este sentido, en los últimos años se han identificado nuevos marcadores aberrantes en los MCs patológicos de estos pacientes que confirman la naturaleza clonal de la WDSM; entre ellos se incluyen la expresión aberrante de CD30 (344) y la sobreexpresión de proteasas citoplasmáticas (304), marcadores que podrían ser útiles para el diagnóstico diferencial entre esta entidad y la CM. No obstante, debido al número limitado de casos descritos hasta la fecha, son necesarios estudios detallados sobre un número relativamente amplio de pacientes con WDSM para poder establecer criterios diagnósticos específicos que permitan una correcta identificación de esta rara variante de mastocitosis.

Ante estos antecedentes, en esta tesis doctoral nos propusimos tres objetivos principales. Por un lado, nuestro interés se centró en la identificación de factores pronósticos asociados a la progresión de pacientes con ISM a formas avanzadas de la enfermedad. Por otra parte, nos propusimos caracterizar en detalle desde el punto de vista clínico, histopatológico, inmunofenotípico y molecular cada una de las dos nuevas variantes clínicas de SM antes referidas (ISM_s- y WDSM), poniendo especial énfasis en las implicaciones diagnósticas, pronósticas y terapéuticas derivadas del mejor conocimiento de ambas entidades. A continuación se discutirán los resultados más relevantes obtenidos, derivados de la investigación llevada a cabo en relación con cada uno de estos tres objetivos, y recogidos en los ocho trabajos de los que se compone esta tesis: 1) identificación de factores pronósticos en pacientes con ISM, 2) caracterización clínica y biológica de la ISM_s- y sus implicaciones pronósticas y terapéuticas, y 3) caracterización clínica y biológica de la WDSM y sus implicaciones pronósticas y terapéuticas.

4.1. FACTORES PRONÓSTICOS EN LA MASTOCITOSIS SISTÉMICA INDOLENTE

La clasificación actual de la mastocitosis de la OMS tiene una gran relevancia por su impacto en la toma de decisiones terapéuticas, gracias a que permite discriminar de forma inequívoca en el momento del diagnóstico entre variantes de la enfermedad de buen y mal

pronóstico. Sin embargo, dicha clasificación no permite identificar, dentro de las formas indolentes de la enfermedad, aquellos pacientes con riesgo de progresión a una forma avanzada de la misma. Por ello, nuestro primer objetivo se centró en la identificación de factores pronósticos que pudiesen contribuir a predecir el riesgo de progresión clínica de pacientes con ISM. Para ello, estudiamos una serie de 145 pacientes con ISM manejados de forma conservadora, tras una mediana de seguimiento de casi una década, y de los que 5 habían mostrado progresión a formas avanzadas de mastocitosis: tres pacientes desarrollaron una hemopatía asociada (LMA, SMD y *policitemia vera*, respectivamente), un paciente progresó a ASM, y otro a MCL. El análisis multivariado de las diferentes características clínicas y biológicas identificadas en el momento del diagnóstico de la ISM mostró que los valores séricos incrementados de β_2 -microglobulina y la presencia de afectación multilineal de la hematopoyesis de MO por la mutación D816V de *KIT*, constituían los únicos factores pronósticos independientes para progresión de la enfermedad. Además, los pacientes que desarrollaron LMA y SMD fallecieron a causa de ambas enfermedades 4 y 8 años después de su aparición, siendo precisamente el desarrollo de una hemopatía clonal asociada uno de los factores predictivos independientes de mortalidad, junto a la presencia de niveles séricos incrementados de la fosfatasa alcalina y una edad más avanzada (>60 años) al diagnóstico. La existencia de afectación multilineal de la hematopoyesis por la mutación D816V de *KIT* ya había sido puesta de manifiesto en estudios previos en algunos pacientes con formas avanzadas de SM (176,363,364,471,472), corroborando la afectación de un precursor hematopoyético temprano en estos casos. Sin embargo, el impacto pronóstico de la detección de la mutación multilineal de *KIT* en pacientes con formas indolentes de la enfermedad no había sido demostrado previamente de forma fehaciente.

En términos globales, nuestros resultados confirman que, aunque la progresión a formas avanzadas de la enfermedad es muy poco frecuente entre las ISM (<5% de los pacientes analizados), su aparición está íntimamente relacionada con la afectación multilineal de la hematopoyesis por la mutación de *KIT*; así, la progresión de la enfermedad ocurrió en casi la mitad de los pacientes que presentaban mutación multilineal frente a

<1% de los que presentaban mutación de *KIT* restringida al MC. Además, la probabilidad de progresión a formas avanzadas de SM entre los pacientes con mutación multilineal de *KIT* parece depender directamente del tiempo de evolución de la enfermedad, con una mediana de 12 años entre los pacientes que progresaron, frente a una mediana global de seguimiento de 9 años. En este sentido, cabe señalar la posibilidad de que análisis futuros con tiempos de seguimiento más largos podrían determinar con mayor precisión la tasa de progresión de la enfermedad, tanto a nivel global, como de forma específica entre pacientes que presentan mutación multilineal de *KIT*.

El impacto pronóstico de la detección de mutación multilineal de *KIT* en pacientes con ISM demostrado en nuestro estudio ha servido posteriormente de punto de partida para investigar la posible asociación entre este patrón de afectación molecular de la hematopoyesis y otras características biológicas de la enfermedad, que pudieran así constituir también factores predictivos de progresión de ISM a formas avanzadas de mastocitosis. En este sentido, diversos estudios han relacionado la presencia de mutación multilineal de *KIT* y de un mayor riesgo de progresión de ISM a formas avanzadas de mastocitosis con: 1) un patrón inmunofenotípico inmaduro en los MCs de MO (365), 2) un incremento progresivo de triptasa durante el seguimiento a largo plazo de los pacientes (372), y 3) la presencia de niveles plasmáticos elevados de IL-6 al diagnóstico (473). Además, en un trabajo reciente se ha demostrado la utilidad del análisis cuantitativo, mediante técnica de PCR alelo-específica (ASOqPCR) de la mutación D816V de *KIT* en muestras de sangre periférica, como marcador indirecto de la presencia de mutación multilineal en MO, lo cual facilitaría el análisis del grado de afectación de la hematopoyesis por la mutación de *KIT*, incluso cuando no se haya realizado aún estudio de MO (178).

En conjunto, estos hallazgos apoyan una visión más dinámica de la ISM. Así, mientras que en pacientes con mutación de *KIT* restringida al MC, éste muestra en MO un fenotipo maduro asociado a una baja tasa proliferativa y sin variaciones significativas de la carga tumoral a lo largo del tiempo, la presencia de la mutación en un número significativo de precursores tempranos de la hematopoyesis probablemente determina la adquisición de alteraciones genéticas adicionales capaces de favorecer una mayor expansión

clonal de los diferentes compartimentos celulares afectados, con una mayor acumulación de MCs inmaduros propia de las formas avanzadas de mastocitosis; a la vez, en estos pacientes los clones de células de otras líneas hematopoyéticas podrían sufrir también una transformación maligna dando lugar a las hemopatías asociadas a SM.

Desde el punto de vista práctico, la identificación de la presencia de mutación multilíneal de *KIT* como factor pronóstico adverso en pacientes con ISM tiene gran impacto clínico, al permitir identificar ya en los estadios iniciales de la enfermedad aquel subgrupo de pacientes con alto riesgo de progresión. Así, en estos casos parece lógico adoptar un seguimiento más estrecho con la implementación de medidas concretas como: 1) la determinación de triptasa sérica y la realización de pruebas de imagen con una menor periodicidad de lo habitual, 2) la realización de estudios seriados del grado de infiltración medular, y 3) la cuantificación periódica de la carga alélica de la mutación de *KIT* en sangre periférica, con el fin de poder identificar precozmente signos incipientes de progresión e instaurar las correspondientes estrategias terapéuticas.

4.2. CARACTERIZACIÓN DE LA MASTOCITOSIS SISTÉMICA INDOLENTE SIN LESIÓN CUTÁNEA ASOCIADA A ANAFILAXIA (ISM_s-)

Recientemente, se ha propuesto el término MCAS con el fin de englobar todos aquellos procesos cuyas manifestaciones clínicas son consecuencia de mecanismos de activación mastocitaria, y que pueden clasificarse en tres grandes grupos (460,462): 1) MCAS primarios, definidos por la presencia de MCs clonales en MO (SM y MMAS), 2) MCAS secundarios, entre los que se incluirían procesos alérgicos o atópicos mediados por IgE en ausencia de MCs clonales en MO, y 3) MCAS idiopáticos, en los que no se detectan ni MCs clonales en MO, ni alergia.

De forma característica, la SM se define por la presencia de MCs clonales en dos o más tejidos distintos. En adultos, habitualmente está afectada la MO de forma sistemática, pudiendo asociarse o no afectación cutánea. Así, según la clasificación de MCAS antes

referida, sería necesaria la realización de una prueba invasiva como es el aspirado-biopsia de MO en todos los casos para descartar o confirmar la existencia de MCs clonales. No obstante, dada la prevalencia relativamente baja de mastocitosis en la población general y la alta frecuencia de procesos que cursan como MCAS, no resultaría eficiente realizar un estudio de MO a todos los pacientes que presentan síntomas relacionados con la activación de MCs, sino que éste debería, por el contrario, reservarse exclusivamente para casos en los que exista un alto índice de sospecha de SM.

Clásicamente, la cuantificación de los niveles de triptasa sérica se considera que constituye un método sencillo, barato y muy útil para seleccionar aquellos pacientes con MCAS candidatos al estudio de MO, debido a la asociación que existe entre niveles basales elevados de triptasa en sangre y SM (117,119–122). Sin embargo, aunque su utilidad es incuestionable como parte del estudio diagnóstico de SM, la evaluación de los niveles séricos de triptasa también presenta algunas limitaciones derivadas de su falta de sensibilidad y especificidad. A modo de ejemplo, los niveles de triptasa sérica en la mastocitosis guardan correlación con la carga mastocitaria, por lo que pacientes con baja carga mastocitaria presentan habitualmente valores normales ($<11.5 \mu\text{g/L}$) o al menos $<20 \mu\text{g/L}$ (465). Por otro lado, niveles incrementados de triptasa sérica se encuentran también en condiciones diferentes de la mastocitosis como son la anafilaxia (117,122), urticaria crónica (353), insuficiencia renal avanzada (352) y diversas hemopatías mieloides como la LMA, LMC, NMPs y SMD (474). En conjunto, estos hallazgos demuestran la necesidad de establecer criterios adicionales que permitan identificar, dentro de los pacientes que presentan síntomas compatibles con MCAS en ausencia de lesiones cutáneas de mastocitosis, aquellos que tienen una alta probabilidad de padecer una SM y que por tanto, son candidatos al estudio de MO.

El segundo objetivo de esta tesis doctoral se relacionó directamente con esta necesidad, y los resultados obtenidos se han incorporado en tres trabajos relacionados entre sí y encadenados de manera secuencial. En este contexto, merece destacar que en el momento de la publicación de los dos primeros artículos relacionados con este segundo objetivo, no existía aún consenso en cuanto a la terminología a emplear para definir los

diferentes subtipos de MCAS; no obstante, con el fin de facilitar la comprensión lectora, a lo largo de esta sección de la discusión se empleará una terminología homogénea para cada uno de los subtipos de MCAS, que incluyen: 1) ISMs-, mastocitosis sistémica indolente sin lesión cutánea, 2) ISMs+, mastocitosis sistémica indolente con lesión cutánea, 3) MMAS, síndrome de activación mastocitaria monoclonal, 4) c-MCAS, síndrome de activación mastocitaria clonal (primario) sin lesión cutánea, y que incluye la ISMs- y el MMAS, y 5) nc-MCAS, síndrome de activación mastocitaria no clonal.

En relación con la caracterización de la ISMs-, nuestro primer objetivo se centró en la identificación de parámetros clínicos y biológicos asociados a clonalidad en pacientes que debutan con síntomas sistémicos relacionados con activación mastocitaria en ausencia de lesión cutánea, y que permitieran diferenciarlos de los nc-MCAS. Para ello seleccionamos un grupo relativamente homogéneo de pacientes desde el punto de vista clínico, y cuyo estudio de MO incluyera la evaluación de la presencia de aberraciones fenotípicas por citometría de flujo y de clonalidad (molecular) en MCs de MO, empleando técnicas de elevada sensibilidad para minimizar la posibilidad de obtener resultados falsamente negativos. De forma específica, se seleccionaron solo aquellos pacientes que cumplieran todos y cada uno de los siguientes requisitos: 1) presencia de síntomas de liberación de mediadores mastocitarios sistémicos y graves, 2) estudio sistemático de mutaciones en el exón 17 de *KIT* mediante técnica de PNA-PCR o, en ausencia de dichas mutaciones, estudio del patrón de inactivación del cromosoma X (HUMARA, abreviado del inglés: “*human androgen receptor*”), realizados sobre MCs purificados de MO, y 3) análisis de la expresión aberrante de CD25 en MCs de MO mediante citometría de flujo. Como criterio de clonalidad se empleó la presencia de mutaciones de *KIT* o la positividad del test HUMARA, junto a la expresión aberrante de CD25 en MCs de MO. El cumplimiento de ambos criterios (molecular e inmunofenotípico) se consideró un requisito indispensable para establecer el carácter clonal de un MCAS, mientras que la ausencia de ambos se estableció como condición necesaria para descartar clonalidad.

De acuerdo con estas directrices, más de la mitad de los 83 adultos con MCAS analizados fueron clasificados tras el estudio de MO como MCAS clonales (c-MCAS), mien-

tras que los cerca del 40% restantes fueron clasificados como MCAS no clonales (nc-MCAS). Una vez aplicados los criterios de la OMS para diagnóstico de ISM (259), casi la totalidad de los c-MCAS cumplían criterios de ISM; dada la ausencia de lesiones cutáneas típicas de mastocitosis, estos pacientes fueron finalmente diagnosticados de ISMs-. Los únicos tres pacientes con c-MCAS que no cumplían criterios de ISM corresponderían según criterios de consenso actuales (460,462) a MMAS, puesto que presentaban MCs CD25+ con mutación D816V de *KIT* en MO, en ausencia de otros criterios diagnósticos de SM. Sin embargo, cabe señalar que la evaluación citomorfológica de los MCs de MO de estos tres casos no fue valorable debido al reducido número de MCs presentes en la muestra. Además, la determinación seriada de triptasa sérica durante el seguimiento posterior de estos tres pacientes permitió detectar, en uno de ellos, un incremento en los niveles de triptasa sérica $>20 \mu\text{g/L}$ dos años después de su inclusión en el estudio, cumpliendo por tanto este paciente en ese momento criterios de ISMs-; por el contrario, en los otros dos pacientes con MMAS, los niveles de triptasa sérica se mantenían por debajo de $20 \mu\text{g/L}$, aunque en ambos casos el tiempo de seguimiento era menor de un año. Este hecho sugiere que los pacientes con MMAS que cumplen los criterios inmunofenotípico y molecular de la OMS para SM se corresponderían en realidad con estadios iniciales de SM (p. ej., ISMs-), en los cuales existe únicamente un pequeño acúmulo incipiente de MCs patológicos en la MO.

En conjunto, estos hallazgos ponen de manifiesto dos hechos fundamentales en la ISMs-: 1) la relevancia de la carga mastocitaria para el diagnóstico de algunos casos de ISM de acuerdo a los criterios actuales de la OMS, y 2) el carácter dinámico de algunos de estos criterios como la triptasa sérica. En este sentido, tanto el criterio inmunofenotípico (expresión aberrante de CD25) como el criterio molecular (mutación de *KIT*) pueden considerarse criterios estáticos, presentes en la inmensa mayoría de pacientes con SM independientemente de la carga mastocitaria, siempre y cuando para su identificación se utilicen técnicas diagnósticas suficientemente sensibles que permitan su detección incluso cuando el porcentaje de células afectadas es extremadamente bajo. Por el contrario, en fases iniciales de la enfermedad no existirían agregados mastocitarios en MO, ni un

incremento significativo de la triptasa sérica; con el tiempo el número de MCs patológicos tendería a aumentar acumulándose en MO hasta llegar a formar agregados visibles mediante técnicas de inmunohistoquímica; en paralelo al incremento del número de MCs, aumentarían también los niveles de triptasa sérica. Así, en contraposición con la expresión de CD25 y la presencia de la mutación de *KIT* en MCs de MO, la presencia de agregados de MCs en MO y niveles incrementados de triptasa sérica $>20 \mu\text{g/L}$ constituirían criterios dinámicos que dependen de la tasa de acumulación mastocitaria y, en definitiva, del tiempo de evolución de la enfermedad. Con respecto a la existencia de $>25\%$ de MCs de MO con morfología anormal, el criterio diagnóstico citomorfológico, su presencia tampoco parece tener relación directa con la carga mastocitaria total, pero sí con la dificultad para poder identificar y evaluar de forma precisa las características morfológicas de los MCs en pacientes con baja carga mastocitaria, en los que los MCs de MO suelen disponerse dentro de las partículas del grumo medular. Ante estos hallazgos y la mayor sensibilidad de los criterios inmunofenotípico y molecular respecto a los demás criterios diagnósticos de SM (296), cabe plantearse la posibilidad de que cada uno de los criterios diagnósticos actuales de SM de la OMS tenga un peso específico distinto, especialmente a la hora de identificar pacientes con ISM en estadios tempranos de la enfermedad.

Una vez definidos los dos grupos de pacientes con MCAS en función de la presencia o no de rasgos fenotípicos y moleculares de clonalidad (c-MCAS y nc-MCAS, respectivamente), nuestro interés se centró en la identificación de otras características diferenciales entre ambos, que permitieran sospechar su diagnóstico. En este sentido, los resultados de un análisis multivariante mostraron que el género masculino, la presencia de síntomas cardiovasculares (mareo y/o síncope) en ausencia de clínica cutáneo-mucosa (urticaria y angioedema) durante los episodios agudos de liberación de mediadores mastocitarios, y la presencia de niveles elevados de triptasa sérica basal por encima de $25 \mu\text{g/L}$, constituían la mejor combinación de factores predictivos independientes para el diagnóstico de c-MCAS (ISM- y MMAS). Por el contrario, los factores predictivos de nc-MCAS incluían el género femenino, la presencia de urticaria y/o angioedema durante los episodios de liberación de mediadores mastocitarios y la demostración de niveles basales de triptasa

sérica $<15 \mu\text{g/L}$. La potencia de asociación de cada uno de estos factores con la presencia o ausencia de los criterios de clonalidad establecidos en el estudio, permitió desarrollar un sistema de puntuación (*score* de la REMA) que aplicado retrospectivamente mostraba una especificidad superior al 80% con una sensibilidad cercana al 90% para diferenciar entre c-MCAS (ISMs- y MMAS) *vs.* nc-MCAS.

Otro hallazgo importante de nuestro estudio fue la identificación de las picaduras de insectos, fundamentalmente de himenópteros, como el principal factor desencadenante de los episodios de activación mastocitaria entre los pacientes con c-MCAS. Por el contrario, en el grupo de pacientes con nc-MCAS, los episodios de activación mastocitaria eran desencadenados fundamentalmente por fármacos o sin causa aparente (idiopáticos). Aunque la elevada incidencia de c-MCAS entre pacientes con síntomas de activación mastocitaria inducidos por picadura de insectos obliga ya a tener en cuenta este dato como un criterio de sospecha adicional de ISMs-, cuando aplicamos el sistema de puntuación específicamente a este grupo de pacientes, observamos un aumento significativo de la sensibilidad hasta el 97%, con una especificidad del 71%, lo cual sugiere que el modelo predictivo podría ser especialmente útil en estos casos como herramienta de *screening* para identificar pacientes con elevada probabilidad de presentar ISMs-, y como tal, candidatos al estudio de MO.

Además de las diferencias clínicas observadas entre pacientes con c-MCAS y nc-MCAS, constatamos también diferencias biológicas relevantes entre los pacientes con ISMs- y un grupo control de pacientes diagnosticados de ISM con afectación cutánea (ISMs+). Así, los pacientes con ISMs- presentaban con mayor frecuencia una doble población de MCs (normales y patológicos) en MO, tenían una menor frecuencia de agregados de MCs y fibrosis medular, y mostraban niveles séricos de triptasa basal inferiores, con respecto al grupo de pacientes con ISMs+. Por el contrario, los pacientes con ISMs+ presentaban con más frecuencia mutación multilíneal de *KIT* que los casos clasificados como ISMs-. Estos hallazgos sugieren que los pacientes con ISMs- presentan una enfermedad con menor carga mastocitaria que los pacientes con ISMs+, lo cual determinaría la ausencia de agregados de MCs en la MO en una proporción significativa de casos.

Además, dado el impacto pronóstico de la afectación multilineal de la hematopoyesis por la mutación D816V de *KIT* demostrado en esta tesis doctoral, los pacientes con ISMs- tendrían también, en general, un mejor pronóstico que aquellos con ISMs+, al menos en cuanto al riesgo de progresión a formas avanzadas de la enfermedad se refiere. No obstante, debe tenerse en cuenta que los pacientes con ISMs- presentan un riesgo elevado de episodios de liberación de mediadores que pueden ser muy graves e incluso resultar fatales, por lo que requieren de un adecuado manejo terapéutico para asegurar un pronóstico favorable a largo plazo. De forma similar, cerca de una cuarta parte de los pacientes con ISMs- analizados presentaba osteoporosis ya en el momento del diagnóstico, lo cual podría condicionar también una comorbilidad añadida como consecuencia del riesgo incrementado de fracturas óseas.

No obstante todo lo anterior, el modelo predictivo propuesto carecía de validación prospectiva en una serie más amplia de pacientes, lo que constituyó el paso siguiente de nuestro trabajo. Para ello, analizamos un total de 158 pacientes con MCAS en ausencia de lesión cutánea de mastocitosis, incluyendo 75 casos nuevos no seleccionados, entre los que se encontraban también pacientes en los que la expresión aberrante de CD25 o la presencia de mutaciones de *KIT* no habían sido analizadas o no fueron valorables, junto con pacientes que presentaban tan solo uno de los dos criterios de clonalidad anteriores. Según los criterios de inclusión empleados se distinguieron cuatro grupos de pacientes: 1) aquellos que cumplían criterios de SM (ISMs-), 2) los que no cumplían criterios de SM pero presentaban algún criterio de clonalidad (MMAS), 3) los que no cumplían ningún criterio de clonalidad (nc-MCAS), y 4) los que no cumplían criterios suficientes de SM, pero cuyo estudio molecular no fue realizado o no fue valorable, por lo que podrían corresponder a MMAS o nc-MCAS, dependiendo del estado mutacional. Asimismo, los pacientes se agruparon en dos grandes categorías: 1) los que cumplían criterios de SM (ISMs-), y 2) los que no cumplían criterios de SM, entre los que se incluían los casos con MMAS, nc-MCAS y aquellos sin criterios de SM con estado mutacional desconocido. Con ello analizamos la eficacia del modelo predictivo para predecir tanto clonalidad mas-

tocitaria (ISMs- y MMAS *vs.* los demás pacientes) como SM (ISMs- *vs.* los otros casos de MCAS).

En términos globales, y a diferencia de lo observado en la serie retrospectiva en la que todos los pacientes con MMAS presentaron expresión aberrante de CD25 y mutación de *KIT* en ausencia de otros criterios de SM, alrededor de dos terceras partes de los casos clasificados como MMAS en esta serie prospectiva, presentaban mutación de *KIT* en ausencia de expresión aberrante de CD25. Por lo tanto, parece existir dos tipos de MMAS en función de la presencia o no de alteraciones inmunofenotípicas en los MCs de MO. Estos nuevos hallazgos sugieren que los pacientes que presentan ambos criterios (fenotipo aberrante de CD25 y mutación de *KIT*) podrían corresponder a formas incipientes de SM en los que todavía no existe una carga mastocitaria suficiente para producir un incremento de la triptasa sérica ni dar lugar a la formación de agregados de MCs visibles en MO; por el contrario, aquellos que presentan mutación de *KIT* en ausencia de expresión aberrante de CD25 constituirían el verdadero grupo de MMAS.

Otra diferencia respecto al estudio retrospectivo fue la consideración del prurito durante los episodios agudos de liberación de mediadores mastocitarios como una nueva variable dentro del *score* de la REMA, con la misma puntuación que los demás síntomas cutáneo-mucosos (urticaria y angioedema), de tal forma que la presencia de cualquiera de estos tres síntomas tendría una puntuación negativa de -2, y la ausencia de todos ellos una puntuación positiva de +1. En este contexto, el modelo predictivo propuesto demostró también una elevada eficiencia para predecir ISMs- y c-MCAS (la suma de ISMs- y MMAS), con una sensibilidad y especificidad superiores a las obtenidas cuando se consideraban únicamente los niveles de triptasa sérica. Así, más de la cuarta parte de los pacientes del estudio que no cumplían criterios de SM tras realizar un análisis de MO presentaban niveles séricos de triptasa $>25 \mu\text{g/L}$, mientras que más de un 10% de las ISMs- presentaba niveles $<15 \mu\text{g/L}$, lo cual indica que la valoración aislada de los niveles de triptasa sérica tiene un valor limitado como índice de sospecha de patología clonal mastocitaria en pacientes con sintomatología sugestiva de SM en ausencia de lesión cutánea. Por el contrario, la valoración conjunta de los niveles de triptasa sérica basal y el resto

de variables clínicas incluidas en el *score* de la REMA aumentaba considerablemente la probabilidad de clasificar correctamente a los pacientes, antes incluso de realizar pruebas diagnósticas adicionales (p. ej., el estudio de MO).

De acuerdo con los resultados previos del estudio retrospectivo, la picadura de insectos (fundamentalmente himenópteros) constituía el desencadenante de episodios de liberación de mediadores mastocitarios más frecuentemente observado entre los pacientes diagnosticados de ISMs-, siendo además también el factor con mayor prevalencia entre los pacientes con MMAS. Dada la asociación tan clara que existe entre el desarrollo de síntomas sistémicos desencadenados por picaduras de abejas o avispas y la alergia al veneno de las mismas, la demostración de un mecanismo dependiente de IgE, ya fuera mediante pruebas cutáneas o serológicas, fue también más frecuente entre estos pacientes respecto a los nc-MCAS, cuyos síntomas fueron desencadenados fundamentalmente por la exposición a fármacos o por causas desconocidas (idiopáticos). Merece destacar además que la negatividad en las pruebas de alergia en pacientes con anafilaxia por picadura de himenópteros, aunque infrecuente (<15%), se asoció sistemáticamente con el diagnóstico de ISMs-, de acuerdo con hallazgos previos que sugieren que dicha negatividad en pacientes con anafilaxia tras la picadura de himenópteros podría constituir un criterio de sospecha de mastocitosis (229,475–477).

Dada la elevada prevalencia de la picadura de insectos como desencadenante de los episodios agudos de liberación de mediadores mastocitarios entre pacientes con ISMs-, nos propusimos investigar a continuación la posible asociación entre este factor desencadenante de síntomas en MCAS y las características clínicas, biológicas y moleculares típicas de la ISMs- que la diferencian de las ISMs+, además de analizar también de forma específica la eficiencia del *score* propuesto por la REMA en pacientes con anafilaxia por himenópteros, frente a aquellos que presentan otros factores desencadenantes. Para ello, diseñamos un estudio en colaboración con otro Centro de Referencia internacional, la Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata de Verona (Italia), en el que se incluyeron un total de 335 pacientes con MCAS distribuidos en cuatro grupos, en función de la presencia o ausencia de lesiones cutáneas típicas de mastocitosis, el tipo de desencadenante de

los episodios de liberación de mediadores mastocitarios y el resultado del estudio medular: 1) ISMs- asociada a anafilaxia desencadenada por picadura de insectos, 2) ISMs- asociada a anafilaxia desencadenada por otras causas, 3) ISMs+ asociada a anafilaxia desencadenada por cualquier causa, y 4) nc-MCAS cuyos síntomas eran desencadenados por cualquier causa.

Una vez seleccionados los pacientes que no presentaban lesión cutánea típica de mastocitosis (ISMs- y nc-MCAS) confirmamos el valor predictivo del *score* de la REMA, que mantenía una elevada eficiencia a la hora de predecir ISMs-, con una sensibilidad y especificidad similares a las obtenidas en las series anteriores, tanto en términos globales como al agrupar a los pacientes en función del factor desencadenante de los episodios de activación mastocitaria (**TABLA 9**).

TABLA 9. Sensibilidad y especificidad del sistema de puntuación de la REMA como modelo predictivo de mastocitosis sistémica en pacientes con síntomas de liberación de mediadores mastocitarios en ausencia de afectación cutánea.

FUENTE		PACIENTES	SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD
Alvarez-Twose JACI 2010	Global (SM)	83	92%	81%
	Insectos	36	97%	71%
	Otras causas	47	86%	84%
Alvarez-Twose IAAI 2012	Global (SM)	158	87%	73%
	Global (clonalidad*)	158	84%	74%
Alvarez-Twose JACI 2015	Global (SM)	279	91%	75%
	Insectos	155	92%	67%
	Otras causas	124	88%	77%
REMA‡ 1999-2016	Global (SM)	545	88%	63%
	Global (clonalidad*)	545	85%	64%
	Insectos	202	90%	56%
	Otras causas	343	86%	65%
	Triptasa <11.5 µg/L	95	81%	64%
	Triptasa >40 µg/L	85	94%	71%

SM, mastocitosis sistémica; REMA, Red Española de Mastocitosis, JACI, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*; IAAI, *International Archives of Allergy and Immunology*; SM, mastocitosis sistémica.

*Incluye la suma de casos con ISMs- y MMAS.

‡Datos no publicados.

El análisis comparativo de los tres grupos de pacientes con ISM demostró que los casos diagnosticados de ISMs- asociada a anafilaxia desencadenada exclusivamente por insectos presentaban valores inferiores de triptasa sérica basal, mayor frecuencia de doble población mastocitaria (coexistencia de MCs normales y MCs patológicos) y menor frecuencia de agregados de MCs y de fibrosis de MO, respecto tanto a los pacientes con ISMs+ como a casos que presentaban ISMs- asociada a anafilaxia por otras causas. Estos hallazgos sugieren que la ISMs- asociada a anafilaxia por picadura de insectos representa un subtipo de ISMs- en el que la carga mastocitaria es particularmente baja. Además, el estudio molecular realizado en estos pacientes demostró que ninguno de ellos presentaba mutación multilíneal de *KIT*, mientras que ésta afectaba a casi el 10% de los pacientes con ISMs- asociada a anafilaxia por otras causas y cerca de una cuarta parte de las ISMs+. Dada la asociación encontrada entre mutación multilíneal de *KIT* y la probabilidad de progresión de ISM a formas avanzadas de mastocitosis, podemos concluir que los pacientes con ISMs- asociada a anafilaxia desencadenada exclusivamente por picadura de insectos tienen un riesgo prácticamente nulo de progresión a formas más avanzadas de la enfermedad. En este sentido, el diagnóstico de ISMs- cuando el único desencadenante de anafilaxia es la picadura de insectos tendría implicaciones terapéuticas, puesto que, previsiblemente, estos pacientes nunca necesitarán tratamiento citorreductor, siendo por el contrario candidatos a inmunoterapia frente al veneno responsable de los síntomas.

Nuestros resultados confirmaron también que prácticamente 8 de cada 10 pacientes con ISMs- asociada a anafilaxia por picadura de insectos eran hombres. Aunque se ha sugerido que esto sea debido a que las profesiones de ámbito rural que condicionan un mayor riesgo de exposición a picaduras de himenópteros (p. ej., las relacionadas con agricultura, ganadería y apicultura) son tradicionalmente desempeñadas con mayor frecuencia por hombres que por mujeres, esta hipótesis sigue sin confirmarse. Por el contrario, tanto la ISMs- asociada a anafilaxia por otras causas como la ISMs+, afectaban prácticamente por igual a hombres y mujeres. Globalmente, estos hallazgos demuestran que las principales diferencias biológicas y moleculares observadas previamente entre pacientes con ISMs+ e ISMs- como son la menor carga mastocitaria y la menor frecuencia de mutación

multilineal de *KIT* típicas de la ISMs-, así como su mayor incidencia en hombres, se deben fundamentalmente a diferencias entre las ISM+ y el grupo específico de ISMs- asociada a anafilaxia desencadenada por picadura de insectos.

Desde el punto de vista clínico, los pacientes con ISMs- asociada a anafilaxia por picadura de insectos también presentaban características diferenciales con respecto a los otros dos grupos de pacientes. Así, durante los episodios de anafilaxia estos pacientes presentaban un patrón clínico caracterizado fundamentalmente por sintomatología cardiovascular (p. ej., mareo, hipotensión y pérdida de conocimiento), típicamente en ausencia de picor, urticaria, angioedema, *flushing*, síntomas digestivos, rinoconjuntivitis y cefalea, a diferencia de lo observado tanto en pacientes con ISMs- asociada a anafilaxia desencadenada por otras causas como en aquellos con ISMs+. Además, en los pacientes con ISMs- y anafilaxia por picadura de insectos, tanto el *flushing* como la sintomatología digestiva eran significativamente menos frecuentes también fuera de los episodios de anafilaxia, con respecto a los otros dos grupos de pacientes; estos resultados sugieren que el tipo de mediadores mastocitarios liberados en los pacientes con ISMs- asociada a anafilaxia por insectos podría ser diferente al de otros tipos de mastocitosis.

Otro hallazgo que cabe señalar está relacionado con el hecho de que, aunque solo 10% de todos los pacientes con ISMs- o ISMs+ en los que se identificó la picadura de himenópteros como desencadenante de episodios de anafilaxia presentaban pruebas convencionales de alergia negativas, este porcentaje es significativamente superior al descrito en la población general (<1%) (476,478). Además, en cerca de dos terceras partes de estos casos fue posible demostrar la existencia de un mecanismo dependiente de IgE mediante la demostración de la existencia de anticuerpos de tipo IgE específicos frente a antígenos nativos. Algunos autores han sugerido que esta discrepancia entre la negatividad de las pruebas de alergia convencionales y la positividad mediante el empleo de técnicas de mayor sensibilidad observadas en algunos pacientes, podría explicarse por una mayor tasa de anticuerpos (IgE) específicos unidos al receptor FcεRI en la superficie de los MCs, como consecuencia de la mayor carga mastocitaria existente en pacientes con ISM respecto a sujetos normales (479). De cualquier forma, la demostración de un mecanismo

dependiente de IgE en estos casos es de gran trascendencia clínica, puesto que brinda la posibilidad de desensibilización mediante inmunoterapia específica en algunos pacientes previamente considerados como “no alérgicos” y, por tanto, no candidatos a la misma.

4.3. CARACTERIZACIÓN DE LA MASTOCITOSIS SISTÉMICA BIEN DIFERENCIADA (WDSM)

El tercer objetivo de esta tesis doctoral se centró en la caracterización clínico-patológica de la WDSM y las implicaciones pronósticas y terapéuticas derivadas de un mejor conocimiento de esta nueva variante de mastocitosis. A pesar de sus particularidades clínicas, la WDSM en realidad no constituye una forma clínica de mastocitosis como tal, sino una variante biológica con características únicas que puede mostrar un comportamiento clínico heterogéneo, similar al de cualquiera de las diferentes formas clínicas de mastocitosis.

Desde su primera descripción en el año 2004 (199), hasta la fecha tan solo se han publicado casos aislados de mastocitosis con las características citomorfológicas e inmunofenotípicas que definen la WDSM (197,198,480), incluyendo los pacientes de la REMA descritos en esta tesis doctoral. Este número tan limitado de pacientes con WDSM descritos se debe, en gran medida, a su baja frecuencia respecto al resto de SM, pero también a las limitaciones de los criterios actuales de la OMS para diagnóstico de SM. En este sentido, estos criterios diagnósticos no permiten demostrar el carácter sistémico y/o clonal de la enfermedad en muchos pacientes con WDSM, particularmente en aquellos que presentan una carga mastocitaria baja, poniendo de relieve la necesidad de establecer criterios diagnósticos específicos para esta nueva variante de SM. Con el fin de establecer una distinción clara entre la WDSM y la SM con MCs morfológicamente anormales y/o expresión intensa de CD25 y/o CD2, esta última será referida a lo largo de este apartado de la discusión bajo la denominación común de “SM típica”.

Con el objetivo de analizar las características clínicas, biológicas y moleculares de la WDSM y establecer criterios diagnósticos específicos que permitan su correcta iden-

tificación, independientemente de la carga mastocitaria y del cumplimiento o no de los criterios diagnósticos de SM aceptados por la OMS (259), seleccionamos un grupo de pacientes que cumplieran tres criterios básicos: 1) que tuvieran lesión cutánea histológicamente compatible con mastocitosis, 2) que los MCs de MO tuvieran una morfología aparentemente normal (redondos y bien granulados) y carecieran de expresión intensa de CD25 y CD2, y 3) que presentaran evidencia de clonalidad en los MCs de MO, reflejada en la presencia de agregados mastocitarios, la existencia de cualquier mutación de *KIT* y/o la demostración de un patrón clonal de inactivación del cromosoma X en mujeres.

Globalmente, solo una cuarta parte de los 33 pacientes incluidos en el estudio cumplía los criterios de SM de la OMS, mientras que las tres cuartas partes restantes quedarían clasificados como CM de acuerdo a dichos criterios. Sin embargo, el estudio de la MO de los pacientes demostró la presencia de algunos hallazgos comunes a otras formas de SM e indicativos de enfermedad sistémica clonal, y que están ausentes de forma sistemática en pacientes con CM. Entre éstos se incluían: 1) la presencia en MO de agregados de >15 MCs por inmunohistoquímica en más de dos tercios de los casos, 2) la expresión aberrante de CD30 por citometría de flujo y/o por inmunohistoquímica en más de 70% de los pacientes, 3) la presencia de mutaciones de *KIT* en cerca de un tercio de los pacientes, incluyendo la D816V en la mitad de ellos y otras mutaciones (I817V, N819Y y K509I) en la otra mitad, y 4) un patrón clonal de inactivación del cromosoma X en los MCs de MO en más de la mitad de las mujeres estudiadas que no presentaban mutación de *KIT*. Además, estos pacientes mostraron de forma recurrente otras características diferenciales con respecto a las formas típicas de SM, como: 1) pequeños grupos de 2-3 MCs fuera del grumo medular en las extensiones del aspirado de MO, 2) un patrón inmunofenotípico característico consistente en una expresión anormalmente baja de CD117 y FcεRI, sobreexpresión de CPA intracitoplasmática y un FSC (*forward scatter*) y SSC (*side scatter*) por citometría de flujo anormalmente elevados, además de una expresión débil o negativa de CD25 y/o CD2. Estos hallazgos indican que la población mastocitaria de MO en la WDSM no es normal como cabría esperar en pacientes con CM pura, aunque en muchos

de estos pacientes no se cumplieran de forma estricta los criterios diagnósticos actuales de la OMS para SM.

Desde el punto de vista clínico, las principales características de los pacientes con WDSM analizados incluían: 1) predominio (>80%) en mujeres adultas, 2) aparición de lesiones cutáneas en la infancia en la mayoría (>90%) de los pacientes, y 3) agregación familiar en casi 40% de los casos. A diferencia de lo observado en la WDSM, en las formas típicas de SM no existe una clara predilección por ninguno de los dos sexos (excepto en las ISMs- que son más frecuentes en hombres, como hemos referido previamente en esta tesis doctoral), la enfermedad generalmente aparece en edad adulta y las formas hereditarias son excepcionales (214,228,481).

Al igual que en la SM típica, el tipo de afectación cutánea observado con mayor frecuencia en los pacientes con WDSM fue la MPCM; sin embargo, en estos últimos, la localización de las lesiones era típicamente troncular, generalmente sin afectación de extremidades y con lesiones característicamente sobreelevadas en la región cervical, mientras que aunque en la SM típica también existe habitualmente afectación del tronco, ésta tiende a tener una distribución centrífuga, de manera que las raíces proximales de miembros (sobre todo los muslos) suelen verse afectadas en un porcentaje significativo de casos y las lesiones son menos sobreelevadas (173). Desde el punto de vista histológico, los MCs dérmicos de la WDSM presentaban las mismas características morfológicas que los de MO, es decir, forma redonda y abundante granulación, y con una disposición “en hileras” en la mayoría de los casos. Respecto a la distribución de los diferentes síntomas relacionados con la liberación de mediadores mastocitarios, ésta fue similar entre los pacientes con WDSM analizados y la descrita en la SM típica, excepto por una frecuencia llamativamente elevada de episodios de *flushing* (>80% de los casos) que a menudo se acompañaba de otros síntomas de perfil cardiovascular como palpitaciones, cefalea, mareo o síncope.

En cuanto a los niveles de triptasa sérica, los pacientes con WDSM mostraban una relación triptasa sérica/porcentaje de MCs en MO significativamente inferior a la de la SM típica, siendo por lo tanto los niveles séricos de triptasa en estos pacientes inferiores a lo esperado para su carga mastocitaria. Este hallazgo puede explicarse por un incremento

de la concentración intracelular de triptasa (y otras proteasas) en los MCs de la mayoría de pacientes con WDSM, demostrado tanto en el examen citológico de la MO como por el patrón de sobreexpresión de estas proteasas por citometría de flujo.

En conjunto, estos hallazgos nos han permitido identificar una serie de características típicas de la WDSM que contribuyen, por un lado, al diagnóstico de la entidad a través de una mejor definición de su naturaleza clonal y sistémica, y por otra parte, a su distinción de las formas típicas de mastocitosis. De todas estas características, la más relevante por las implicaciones terapéuticas que conlleva es, sin duda, la baja frecuencia de mutaciones en el exón 17 de *KIT* comparado con la SM típica. En la actualidad es bien conocido que la presencia de la mutación D816V de *KIT* confiere resistencia al tratamiento con imatinib (359–362), por lo que los pacientes con SM que presentan esta mutación, y que representan más del 95% de los casos (176,178,304,356,482), no serían en principio candidatos a esta terapia. Por el contrario, diferentes estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que el imatinib es capaz de inhibir la actividad de Kit tanto en su forma silvestre (333,448) como cuando presenta mutaciones localizadas fuera del dominio catalítico de la molécula, como la del419 (187) y las mutaciones K509I (196–198), F522C (199) y V560G (361). Basado en los resultados clínicos de varios casos aislados y series cortas de pacientes, la FDA americana aprobó ya en el año 2006 el uso de imatinib en pacientes con ASM en los que no se detecta la mutación D816V de *KIT*.

En conjunto, estos hallazgos sugieren que el tratamiento con imatinib podría tener especial relevancia en pacientes con WDSM, aspecto en el que centramos de forma específica nuestro interés en esta tesis doctoral. En este sentido, la evaluación preliminar de la respuesta al tratamiento con imatinib en un paciente diagnosticado de una forma indolente de WDSM en el que no se detectaron mutaciones en los exones 10, 11 y 17 de *KIT*, confirmó la utilidad de este tratamiento citorreductor. Actualmente se considera que, en general, las formas indolentes de mastocitosis no requieren de tratamiento más allá del puramente sintomático, debido a que la esperanza de vida de estos pacientes es comparable a la de la población general (288). Aunque el paciente tratado no presentaba una WDSM avanzada, sufría una profunda afectación psicológica que se acompañaba de idea-

ción autolítica como consecuencia de la extensa afectación cutánea que presentaba; esta situación motivó, en ausencia de mutaciones en el dominio catalítico de *KIT*, la decisión de iniciar el tratamiento con imatinib. El paciente recibió imatinib a una dosis inicial de 100 mg/día durante 10 días, que fue incrementada a 200 mg/día durante 6 meses y posteriormente, recibió una dosis de mantenimiento de 300 mg/día. El tratamiento resultó no solo en la desaparición completa de las lesiones cutáneas y la consiguiente resolución del cuadro psicológico que motivó la administración de imatinib, sino también en la desaparición de los agregados de MCs en MO y de los síntomas de liberación de mediadores mastocitarios que presentaba, junto a una disminución de >70% de los niveles basales de triptasa sérica.

Antes de la publicación de este caso, solo se habían descrito 17 pacientes con mastocitosis con respuesta completa a imatinib. De ellos, 15 correspondían a SM-AHNMD asociadas a alteraciones genéticas del gen *PDGFR* (449–453,483–485), con reordenamiento *BCR-ABL1* (486), o con *KIT* no mutado (487), uno correspondía a un MCS con *KIT* silvestre (333) y el caso restante era un paciente con mastocitosis (sin que se especificara el subtipo concreto de la enfermedad) negativo para la mutación D816V de *KIT* (488). Por otro lado, en ese momento solo habían sido publicados tres casos con diagnóstico (o hallazgos altamente sugestivos) de WDSM que hubiesen sido tratados con imatinib. Estos tres casos tenían en común una elevada carga mastocitaria (1 ASM, 1 SSM y 1 MCL) y la presencia de alguna mutación en los exones 9 ó 10 de *KIT* (F522C, K509I y p.A502_Y503 dup, respectivamente), mostrando únicamente dos de ellos afectación cutánea en el momento de iniciar el tratamiento (194,196,199). La respuesta global objetivada tras el tratamiento en estos tres casos fue excelente aunque incompleta, con disminución significativa de la carga mastocitaria medular y/o mejoría drástica de diferentes signos y síntomas de la enfermedad como megalias, alteraciones de transaminasas, citopenias o niveles de triptasa sérica. En cuanto a la afectación cutánea, en uno de los casos no se hacía referencia específica a cambios en la piel tras el tratamiento (196), mientras que en el otro la respuesta fue descrita como de una “considerable mejoría” en ausencia de ilustración gráfica de la misma (194). De hecho, en los únicos casos (n=3) de mastocitosis referidos previamente

en forma de publicación en los que la respuesta cutánea a imatinib fue ilustrada mediante fotografías tomadas antes y después del tratamiento, se observaban únicamente respuestas parciales, en ausencia de referencia a cambios histológicos (226,450,489).

Ante estos antecedentes, nuestro paciente representa no solo el primer caso de WDSM indolente con respuesta completa (medular y cutánea) a imatinib, sino también el primer caso de mastocitosis en el que la resolución de las lesiones cutáneas tras el tratamiento ha sido documentada gráficamente, tanto desde el punto de vista macroscópico—según lo recomendado para la validación de la respuesta cutánea en pacientes con mastocitosis (490)—, como desde el punto de vista de la infiltración histológica. Además, en la descripción de este caso demostramos por primera vez la eficacia de una dosis de imatinib inferior a 400 mg/día para alcanzar la remisión completa de una forma de SM diferente a la SM asociada a SHE o CEL y alteraciones del gen *PDGFR*, en las que típicamente se obtienen respuestas con dosis de 100 mg/día (449,451,452,485).

La excelente respuesta obtenida tras el tratamiento con imatinib en el paciente con WDSM referido anteriormente, unido al número creciente de casos de mastocitosis negativos para la mutación D816V de *KIT* en los que no se observa respuesta a imatinib publicados desde entonces, sentaron las bases para el siguiente objetivo de este trabajo: tratar de esclarecer cuál es la eficacia real del tratamiento con imatinib en pacientes con mastocitosis que no presentan mutaciones en el dominio catalítico de *KIT*, especialmente en la WDSM, y cuáles son los factores críticos que determinan una buena respuesta terapéutica. Para ello, tras una revisión bibliográfica exhaustiva de los 121 casos de mastocitosis tratados con imatinib que habían sido publicados hasta la fecha, diseñamos un ensayo clínico independiente dirigido al tratamiento con imatinib de 10 pacientes con SM en los que no se detectaron mutaciones en el exón 17 de *KIT*. Las principales características diferenciales de este ensayo clínico con imatinib, respecto a estudios anteriores, incluían: 1) la ausencia de mutaciones en el exón 17 de *KIT* demostrada en todos los pacientes en MCs purificados de MO de forma previa a su inclusión en el ensayo, con el fin de reducir al mínimo la posibilidad de resultados moleculares falsamente negativos y evitar así cualquier sesgo en la selección de casos, y 2) evaluación de la respuesta global al tratamiento

basada en criterios homogéneos que permitían distinguir entre respuestas en términos de citorreducción y respuestas sintomáticas, de manera que solo las primeras fuesen consideradas como respuestas “reales”.

De los 10 pacientes incluidos en el ensayo clínico, 9 cumplían los criterios diagnósticos de WDSM antes referidos, mientras que el otro paciente presentaba una SM-AHNMD, siendo la hemopatía asociada una CEL sin alteraciones del gen *PDGFR*. Según la clasificación de la OMS (165,166), los diferentes subtipos de mastocitosis que presentaban los pacientes con WDSM fueron: 3 MCL, 3 ISM y 3 CM. Todos los pacientes, excepto el caso de SM-CEL, presentaban lesiones cutáneas y, en menor o mayor medida, síntomas relacionados con la liberación de mediadores mastocitarios. Cabe mencionar que, aparte de confirmar la ausencia de mutaciones específicamente en el exon 17 de *KIT* en todos los pacientes incluidos en el ensayo clínico, también se llevó a cabo la secuenciación de la mayor parte del resto de exones del gen *KIT*, lo que permitió identificar la mutación germinal K509I (exon 9) en tres pacientes miembros de una misma familia (el padre y sus dos hijas), que además presentaban hallazgos compatibles con GIST (demostrado histológicamente en el padre y con imágenes radiológicas sugestivas en las dos hijas). La dosis de imatinib administrada en los pacientes con formas avanzadas de mastocitosis y/o que presentaban una infiltración mastocitaria en MO >30% y/o un GIST asociado fue de 400 mg/día, mientras que el resto de pacientes recibió una dosis de 300 mg/día. La duración prevista del tratamiento era de 12 meses, durante los cuales se llevaron a cabo evaluaciones periódicas de la frecuencia y severidad de los síntomas relacionados con la liberación de mediadores mastocitarios, del aspecto macroscópico de las lesiones cutáneas y de los niveles de triptasa sérica. La evaluación de la respuesta medular se realizó una vez finalizado el periodo de tratamiento (mes +12), pero también en el mes +6 en aquellos pacientes que recibían 400 mg/día, de manera que si estos últimos no presentaban cambios significativos en el grado de infiltración medular en ese momento, eran considerados ya como no respondedores y debían abandonar el ensayo.

En términos globales, el tratamiento fue bien tolerado y se obtuvo una respuesta objetiva al tratamiento en la mitad de los pacientes, incluyendo cuatro casos (3 WDSM

y el paciente con SM-CEL) con respuesta completa de la enfermedad, y un paciente con WDSM que alcanzó una respuesta parcial consistente en una disminución del 50% en la infiltración medular y del 20% en los niveles de triptasa sérica, junto a una mejoría de la afectación cutánea y la desaparición tanto de los síntomas de activación mastocitaria como de la hepatomegalia que presentaba antes del tratamiento. En dos pacientes con WDSM se suspendió el tratamiento con imatinib a los 6 meses de iniciado el mismo debido a la falta de respuesta a nivel medular en ese momento; por el contrario, los otros tres pacientes con WDSM completaron los 12 meses de tratamiento sin que se objetivara repuesta en términos de reducción de la carga mastocitaria ni de la afectación cutánea, aunque los niveles de triptasa sérica disminuyeron en los tres casos y los síntomas de activación mastocitaria mejoraron también en uno de ellos. Uno de los aspectos más relevantes del estudio fue comprobar que tres de los cuatro pacientes que alcanzaron respuesta completa se correspondían con aquellos pacientes en los que se había demostrado la mutación K509I en el exón 9 de *KIT*, mientras que en ninguno de los no respondedores se detectaron mutaciones de *KIT*.

Una revisión exhaustiva de los casos de mastocitosis tratados con imatinib previamente referidos en la bibliografía nos permitió identificar un total de 121 pacientes con diferentes variantes clínicas de mastocitosis y diferentes tipos de estado mutacional (121,188,194,196–199,219,226,332,333,448–453,483–489,491–507). La tasa de respuesta global (completa y parcial) a imatinib de estos 121 casos, sumados a los 10 pacientes incluidos en nuestro ensayo clínico, fue de 53%, con solo un 23% de respuestas completas. Un análisis más detallado de cada caso permitió comprobar que los criterios utilizados para considerar respuesta parcial fueron muy heterogéneos, incluyendo en esta categoría de respuesta algunos casos que presentaban disminución de la carga mastocitaria, pero también pacientes que únicamente presentaban mejoría de los síntomas relacionados con la liberación de mediadores mastocitarios. De hecho, considerando únicamente como verdaderos respondedores los pacientes en los que se hubiera demostrado una reducción de la infiltración mastocitaria de la MO $\geq 50\%$, la tasa de respuesta global en toda la serie se redujo al 37%. Teniendo en cuenta este criterio de respuesta, el análisis del tipo de

respuesta en función del estado mutacional de los pacientes en las publicaciones previas a nuestro ensayo permitió extraer las siguientes conclusiones: 1) todos los pacientes evaluables para respuesta en términos de reducción de la carga mastocitaria de MO que presentaban mutaciones en los exones 9 ó 10 de *KIT* (cuatro pacientes con la mutación K509I, uno con la mutación F522C y uno con la mutación p.A502_Y503dup) (194,196–199) o reordenamiento de los genes *PDGFR A* (n=5) (449–451) y *PDGFR B* (n=2) (452,453) mostraron una respuesta completa o casi completa a imatinib, 2) la tasa de respuesta a imatinib entre los pacientes que no presentaban mutaciones de *KIT*, que sería del 80% según lo reflejado en cada una de las publicaciones, quedaría reducida al 25% una vez excluidos los pacientes que presentaban reordenamiento de los genes *PDGFR*, y 3) la tasa de respuesta a imatinib entre los pacientes en los que no se había investigado el estado mutacional de *KIT* sería de tan solo 3%, lo cual contrasta con el 15% calculado a partir de las respuestas indicadas en cada una de las publicaciones.

En conjunto, estas observaciones cuestionan claramente las indicaciones del tratamiento con imatinib en mastocitosis aprobadas por la FDA en 2006, que incluyen el tratamiento de ASM sin mutación D816V de *KIT* o con estado mutacional desconocido. Así, según nuestros resultados, la máxima eficacia del tratamiento con imatinib en términos de reducción de la carga mastocitaria en pacientes con SM que no presentan la mutación D816V de *KIT* dependería de la presencia de alteraciones genéticas sensibles al fármaco, como las mutaciones en los dominios transmembrana o yuxtamembrana de *KIT* o los reordenamientos de *PDGFR*, más que a la ausencia de la mutación D816V por sí misma. Por otro lado, las posibilidades de obtener una respuesta objetiva a imatinib en aquellos pacientes con SM en los que no se había investigado la presencia de la mutación D816V de *KIT* se situaría en torno al 3%, una frecuencia similar a la de las SM en las que no se detecta esta mutación cuando se aplican métodos diagnósticos altamente sensibles; por todo ello, la indicación de la FDA para este último grupo de pacientes queda claramente en entredicho. Además, dado que algunas de las respuestas completas obtenidas tras tratamiento con imatinib ocurrieron en pacientes con formas de mastocitosis diferentes a ASM como MCL (194,197), ISM (197,198,448,483), SSM (483) o SM-AHNMD (449–

453,486,487), parece razonable no restringir el uso potencial de este fármaco a pacientes con ASM, como aconseja la FDA, siempre y cuando se demuestre la presencia de mutaciones en los dominios transmembrana o yuxtamembrana de *KIT* o de reordenamientos de los genes *PDGFRA* y *PDGFRB*. Por otro lado, la baja tasa de respuesta a imatinib observada entre pacientes que no presentan ni mutación de *KIT* ni reordenamiento de *PDGFR*, cuestiona también el uso generalizado de este tratamiento para esta indicación de la FDA, sobre todo si tenemos en cuenta la posibilidad de resultados moleculares falsamente negativos si no se aplican técnicas diagnósticas de alta sensibilidad. Con todo, cabe señalar que al menos una cuarta parte de los pacientes que no presentan alteraciones genéticas conocidas sensibles a imatinib, en ausencia de mutaciones en el dominio catalítico de *KIT*, podrían responder al tratamiento. Ante esta situación, la decisión final sobre el empleo de imatinib en esta indicación debería basarse en consideraciones puramente clínicas como puedan ser el diagnóstico de una forma de SM de mal pronóstico, la existencia de afectación cutánea extensa con impacto a nivel psicológico, o la presencia de síntomas relacionados con la liberación de mediadores mastocitarios refractarios a tratamientos antimedidores convencionales.

Otra de las conclusiones de nuestro trabajo deriva de la confirmación de la estrecha asociación existente entre el diagnóstico de WDSM y la presencia de mutaciones en los dominios transmembrana y yuxtamembrana de *KIT*, como demuestra el hecho de que al menos ocho de los nueve pacientes publicados hasta la fecha en los que se detectaron este tipo de mutaciones (incluyendo los tres pacientes con la mutación K509I incluidos en nuestro ensayo clínico), fueron diagnosticados de WDSM, o presentaban hallazgos altamente sugestivos de WDSM (194,196–199). Este hecho pone de manifiesto la importancia de reconocer de forma adecuada esta variante de SM y la sitúa como el tipo de mastocitosis en el que el estudio molecular de mutaciones de *KIT* potencialmente sensibles a imatinib adquiere mayor relevancia.

No obstante todo lo anterior, cabe señalar que seguimos sin disponer de un tratamiento citorreductor eficaz para la mayoría de los pacientes con SM típica y alrededor de la mitad de las WDSM, lo cual obliga a la búsqueda de nuevas estrategias terapéuti-

cas. En este contexto, en la presente tesis doctoral tuvimos la oportunidad de evaluar la eficacia potencial de nuevas drogas, tras fracaso del tratamiento con imatinib en uno de los casos de WDSM avanzada incluidos en el ensayo clínico referido anteriormente. Se trataba de una paciente diagnosticada de WDSM a los 69 años de edad tras una historia de 9 años de evolución de un mastocitoma solitario localizado en el brazo derecho, asociado a múltiples episodios de anafilaxia. El estudio diagnóstico inicial reveló la presencia de una infiltración masiva de MO por MCs con morfología e inmunofenotipo característicos de WDSM, en ausencia de mutación de *KIT*, y que cumplía criterios de MCL. Tras la falta de respuesta a imatinib, la paciente recibió de manera secuencial tratamiento con IFN- α 2b pegilado, hidroxiurea, midostaurina y cladribina, sin que se observase una respuesta significativa a ninguno de estos fármacos. Finalmente, optamos por evaluar la posibilidad de un tratamiento compasivo con gemtuzumab-ozogamicina, con el que se obtuvo una remisión completa de la enfermedad. Este fármaco incluye un anticuerpo humanizado dirigido frente al antígeno CD33, conjugado con el antibiótico citotóxico calicheamicina que, aunque había sido utilizado con frecuencia en el pasado para el tratamiento de LMAs que expresan el antígeno CD33, fue retirado precozmente del mercado al no demostrar mejores respuestas que la quimioterapia convencional en esta indicación (508). La particularidad más relevante en cuanto al mecanismo de acción de gemtuzumab-ozogamicina reside en que, tras unirse al antígeno CD33 en la superficie de la célula tumoral, el complejo CD33-fármaco es transportado al interior de los lisosomas donde la calicheamicina es liberada produciendo roturas del ADN y apoptosis; mientras tanto, la célula expresa nuevas moléculas de CD33 en su superficie que sirven como nuevas dianas para el fármaco (509). Este proceso de internalización y reexpresión de CD33 determina la acumulación de grandes cantidades de calicheamicina en el interior de aquellas células que expresan niveles elevados de CD33, lo que potencia el efecto citotóxico dirigido del tratamiento, mientras existan niveles suficientes del fármaco en la sangre del individuo. Cabe señalar que el antígeno CD33 es una proteína de membrana presente en prácticamente todos los estadios de diferenciación granulo-monocítica y de maduración del MC, siendo esta última célula, junto al monocito, las células que expresan CD33 con mayor

intensidad (50). La decisión de administrar gemtuzumab-ozogamicina a la paciente se basó en los siguientes hallazgos: 1) la presencia de enfermedad avanzada de mal pronóstico refractaria a los tratamientos convencionales, 2) la existencia de casos previos de SM con excelente respuesta a otros anticuerpos monoclonales como anti-CD25 (daclizumab) (510) y anti-CD30 (brentuximab vedotina) (511), a los que no pudo optar la paciente debido a la falta de expresión intensa de estas moléculas en sus MCs, 3) la demostración de la capacidad de gemtuzumab-ozogamicina de inhibir la proliferación de MCs neoplásicos *in vitro* (512), y 4) la ausencia de otras alternativas terapéuticas.

A pesar de las observaciones previas que sugieren que el tratamiento con gemtuzumab-ozogamicina podría tener una potente actividad antitumoral *in vivo* en pacientes con mastocitosis (512), en el momento de la publicación de nuestro estudio solo había evidencia de una única comunicación en forma de *abstract* en la que un niño de 9 años diagnosticado de SM asociada a LMA con reordenamiento de los genes *RUNX1-RUNX1T1*, alcanzó remisión completa de la leucemia junto a una reducción significativa del componente mastocitario tras tratamiento con gemtuzumab-ozogamicina (513). Por tanto, este estudio representa la primera respuesta completa bien documentada de una SM al tratamiento aislado con gemtuzumab-ozogamicina. La relevancia de este caso es incluso mayor si tenemos en cuenta que se trataba de una paciente de edad avanzada, que presentaba el subtipo clínico de mastocitosis con mayor carga tumoral y peor pronóstico (MCL), que había recibido múltiples terapias citorreductoras sin éxito, y que la secuenciación genómica completa realizada de forma previa a la administración del tratamiento demostró la presencia de cerca de 57.000 mutaciones diferentes, cifra aproximadamente 50 veces superior a lo comúnmente detectado en leucemias agudas y que refleja la profunda alteración de la hematopoyesis que presentaba la paciente. Dado que CD33 se expresa de forma prácticamente sistemática en los MCs de pacientes con mastocitosis con independencia del subtipo específico al que pertenecen, los resultados de este estudio sientan las bases para el desarrollo de ensayos clínicos futuros con gemtuzumab-ozogamicina u otros fármacos anti-CD33 (514), no solo en WDSM avanzadas, sino también en SM típicas de mal pronóstico.

4.4. APLICACIONES PRÁCTICAS DE LOS RESULTADOS DE ESTA TESIS

Los diferentes artículos que componen esta tesis doctoral representan un ejemplo de la investigación traslacional desarrollada con aplicación clínica directa en el diagnóstico y tratamiento de los pacientes con mastocitosis. Además, algunas de estas aplicaciones clínicas redundan también en una mayor eficiencia, con el correspondiente beneficio médico y socioeconómico como consecuencia de una optimización en la selección de pacientes candidatos a realizar determinadas pruebas diagnósticas o a terapias dirigidas de elevado coste. A continuación se detallan las principales áreas relacionadas con la práctica asistencial en las que el trabajo desarrollado ha tenido (y potencialmente tendrá) impacto clínico.

4.4.1. PROPUESTA DE UNA NUEVA CLASIFICACIÓN CLÍNICA Y MOLECULAR DE LA MASTOCITOSIS

Los resultados de los estudios que componen esta tesis doctoral han permitido a la REMA desarrollar un algoritmo diagnóstico y una nueva clasificación clínica y molecular de la SM con implicaciones pronósticas y terapéuticas. Desde el punto de vista diagnóstico, el algoritmo propuesto (**FIGURA 17**) se centra, inicialmente, en la demostración de la existencia o no de afectación cutánea compatible con mastocitosis. A continuación, todos los pacientes (adultos) que presentan lesión cutánea, y aquellos que en ausencia de lesión cutánea muestran una puntuación según el *score* de la REMA ≥ 2 , serían candidatos a la realización de un estudio de MO; por el contrario, en los pacientes en los que no se observan lesiones cutáneas y que presentan un *score* de la REMA < 2 , se podría asumir el diagnóstico de presunción de nc-MCAS, sin necesidad de realizar más estudios. No obstante, en este último grupo de pacientes se recomienda monitorizar los niveles de triptasa sérica al menos una vez al año y realizar reevaluaciones clínicas periódicas, con la intención de detectar un eventual cambio en el valor del *score* de la REMA que ponga de manifiesto la necesidad de realizar el estudio de la MO.

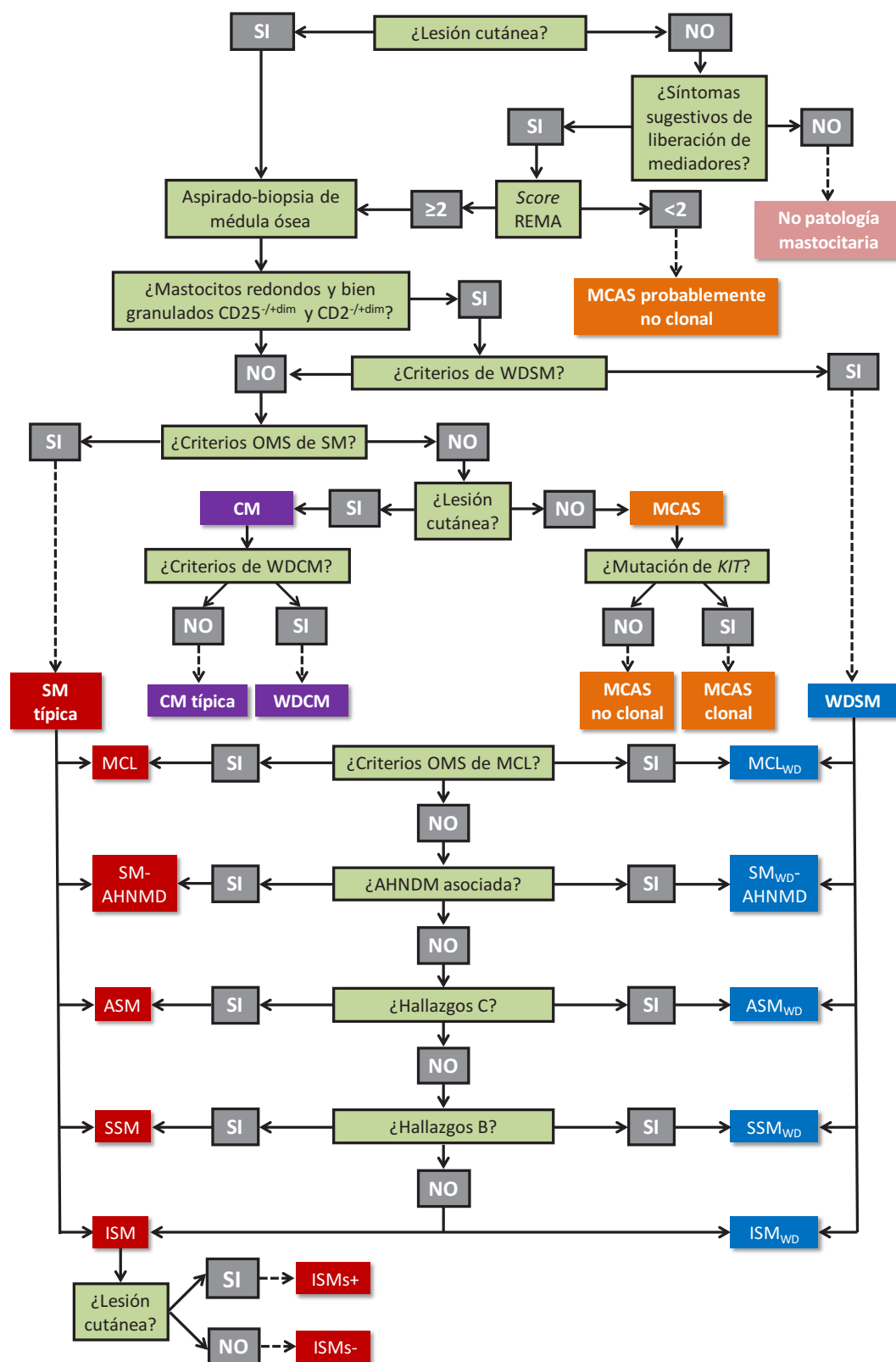


FIGURA 17. Algoritmo propuesto por la REMA para diagnóstico de mastocitosis y sus variantes clínicas y moleculares.

En todos los pacientes en los que el estudio de MO esté indicado, el primer paso sería analizar la expresión inmunofenotípica de CD25 (y CD2) por citometría de flujo, y evaluar la apariencia citomorfológica de los MCs de MO. Si los MCs de MO presentan una expresión intensa de CD25 y/o CD2, y/o una morfología anormal (forma alargada, núcleo excéntrico, hipogranulación, distribución anormal de los gránulos o fenómenos de fusión granular), se deberá investigar la presencia de los demás criterios diagnósticos de la OMS para SM (259), en cuyo caso el diagnóstico final sería de SM (típica). La SM será posteriormente subclasificada en función de los criterios establecidos por la OMS a tal efecto y que incluye la demostración de >20% de MCs en las extensiones del aspirado medular, la presencia de otra enfermedad hematológica de línea no mastocitaria asociada y el hallazgo de signos relacionados con una carga mastocitaria tumoral elevada (criterios-B) o con fallo orgánico (criterios-C) (259), en base a los que se identificarán cada una de las cinco subvariantes principales de SM: ISM, ASM, SSM, SM-AHNMD o MCL.

Por el contrario, si la expresión de CD25 y CD2 en los MCs de MO es negativa (o débilmente positiva) y éstos tienen una morfología redondeada con abundante granulación, deben aplicarse los criterios diagnósticos específicos de WDSM propuestos por la REMA, que incluyen un criterio mayor (agregados de MCs por inmunohistoquímica o citología) y cuatro criterios menores (expresión aberrante de CD30 y/o sobreexpresión de triptasa citoplasmática o CPA, presencia de cualquier mutación de *KIT* o un patrón clonal de HUMARA, demostración de agregados de ≥ 2 MCs fuera del grumo medular por citología, e inicio infantil de lesiones cutáneas y/o agregación familiar en mujeres adultas). La presencia del criterio mayor y al menos un criterio menor, o la presencia de tres o más criterios menores en ausencia del criterio mayor, daría como diagnóstico final WDSM, incluso cuando no se cumplan los criterios aceptados por la OMS para el diagnóstico de SM.

Una vez establecido el diagnóstico de WDSM se deberán aplicar las mismas recomendaciones que se han mencionado para la SM típica para la correcta subclasificación de la WDSM y que darán lugar a las mismas 5 subvariantes de la enfermedad a las que se añade el sufijo WD indicativo de SM “bien diferenciada” (*well-differentiated*): ISM_{WD},

ASM_{WD}, SSM_{WD}, SM_{WD}-AHNMD y MCL_{WD}. En los pacientes con lesiones cutáneas compatibles con mastocitosis en los que una vez realizado el estudio de MO no se cumplen criterios ni de SM típica ni de WDSM, el diagnóstico final sería CM, pudiendo diferenciarse entre CM típica y CM bien diferenciada (CM_{WD}), en función de la ausencia o presencia predominante de MCs redondos y bien granulados en la biopsia cutánea, respectivamente. Finalmente, los pacientes que presentan síntomas sugestivos de liberación de mediadores mastocitarios en ausencia de lesión cutánea y que no cumplen criterios diagnósticos suficientes para SM serían clasificados como MCAS, que a su vez se subclasificarían en MMAS y nc-MCAS según presenten o no mutaciones de *KIT*, respectivamente.

Además, la SM debe clasificarse también desde el punto de vista molecular, dependiendo del estado mutacional de *KIT*, de la localización específica en la secuencia del gen de la mutación detectada y del patrón de afectación de la hematopoyesis por dichas mutaciones. Esta clasificación molecular de la SM no solo guarda una correlación importante con la clasificación clínica referida anteriormente, sino que tiene además implicaciones directas, tanto en el pronóstico como en el tratamiento de los pacientes. Así, según el estado mutacional de *KIT* pueden distinguirse tres grandes categorías de SM (**TABLA 10**): 1) SM con mutaciones en el dominio catalítico (exón 17) de *KIT*, 2) SM con mutaciones fuera del dominio catalítico de *KIT*, y 3) SM con *KIT* silvestre. Las SM que presentan mutaciones en el dominio catalítico de *KIT* pueden subclasificarse a su vez en SM con la mutación D816V y SM con otras mutaciones en el exón 17 de *KIT*, teniendo todas ellas en común la resistencia intrínseca al tratamiento con imatinib (359–362). La mutación D816V es la mutación de *KIT* más comúnmente detectada en todas las formas clínicas de SM típica incluyendo la ISMs- (>90%), la ISMs+ (~95%), la SSM (>90%), la ASM (>95%), la SM-AHNMD (~85%) y la MCL (~40%), mientras que esta mutación solo se detecta en una minoría (~14%) de las WDSM. A su vez, las mutaciones del dominio catalítico de *KIT* diferentes de la mutación D816V son excepcionales en la SM, y pueden afectar al codón 816 como las mutaciones D816Y, D816H e Ins815-816, habitualmente asociadas a ISMs-, SSM y MCL, o a otros codones del exón 17 como las mutaciones I817V, N819Y o N822Y, presentes en alrededor del 12% de las WDSM. En la SM con mutaciones fuera

del dominio catalítico de *KIT*, éstas se localizan casi siempre en los dominios extracelular o transmembrana del receptor (exones 8, 9 ó 10) y suelen estar asociadas a formas avanzadas de WDSM; no obstante, este tipo de mutaciones sólo están presentes en 10-15% de estos casos. Aún así, su detección es clínicamente relevante ya que los pacientes con SM asociada a este tipo de mutaciones presentan una elevada sensibilidad al tratamiento con imatinib, con una tasa de respuesta de prácticamente el 100% de los casos. Entre este tipo de mutaciones de *KIT* destacan las mutaciones K509I, delD409, F522C y V560G.

TABLA 10. Clasificación molecular de la mastocitosis.

GRUPOS MOLECULARES		FRECUENCIA EN DIFERENTES FORMAS CLÍNICAS DE SM*									IMPLICACIONES PRONÓSTICAS
		FORMAS TÍPICAS DE SM						WDSM‡			
		ISM _s + (n=596)	ISM _s - (n=318)	SSM (n=14)	SM-AHN (n=76)	ASM (n=33)	MCL (n=12)	ISM _{WD} (n=37)	SSM _{WD} (n=1)	MCL _{WD} (n=4)	
TIPO DE MUTACIÓN DE <i>KIT</i>	Mutación D816V de <i>KIT</i>	96 %	91%	93 %	85%	97 %	42 %	14%	0 %	0 %	Resistencia a imatinib
	Otras mutaciones en el exón 17 de <i>KIT</i>	1%	3 %	7 %	2%	0%	25 %	14%	0%	0 %	
	Mutación de <i>KIT</i> fuera del exón 17	0 %	1%	0 %	2 %	0%	8 %	2%	0 %	50 %	Posible sensibilidad a imatinib
	<i>KIT</i> silvestre	3 %	5 %	0 %	11 %	3 %	25 %	70 %	100 %	50 %	
GRADO DE AFECTACIÓN DE LA HEMATOPOYESIS	Mutación de <i>KIT</i> restringida a MCs	67%	87 %	0 %	44 %	0 %	17%	22 %	0 %	0 %	Baja probabilidad de progresión
	Mutación multilíneal de <i>KIT</i>	30 %	8 %	100 %	44 %	97 %	58 %	8 %	0%	50 %	Alta probabilidad de progresión

MC, mastocito; SM, mastocitosis sistémica; WDSM, mastocitosis sistémica bien diferenciada; ISM_s+, mastocitosis sistémica indolente sin lesión cutánea; ISM_s+, mastocitosis sistémica con lesión cutánea; SSM, mastocitosis sistémica quiescente ("smoldering"); SM-AHN, mastocitosis sistémica asociada a hemopatía clonal de línea no mastocitaria; ASM, mastocitosis sistémica agresiva; MCL, leucemia de mastocitos; ISM_{WD}, mastocitosis sistémica indolente bien diferenciada; SSM_{WD}, mastocitosis sistémica quiescente ("smoldering") bien diferenciada; MCL_{WD}, leucemia de mastocitos bien diferenciada

*Según los datos de la REMA analizados en octubre de 2016 (datos no publicados).

‡Únicos subtipos de WDSM identificados por la REMA.

Todas las formas de SM que presentan mutación de *KIT* deben clasificarse también según el número de líneas celulares hematopoyéticas de MO afectadas: 1) SM con mutación restringida al MC (habitualmente con afectación de precursores CD34+), y 2) SM con mutación multilíneal, ya sea mielóide, mielóide y linfóide o germinal (TABLA 10). Esto se debe a que, como hemos demostrado en este trabajo doctoral, los diferentes patrones de afectación de la hematopoyesis por las mutaciones de *KIT* tienen un gran impacto pronóstico. Así, mientras que la presencia de mutación multilíneal se asocia típicamente con formas avanzadas de la enfermedad o con formas indolentes con un riesgo incrementado

de progresión a formas agresivas, la presencia de mutación de *KIT* restringida a MCs es típica de SM indolentes cuya probabilidad de progresión a formas avanzadas de SM es prácticamente nula. Existe también cierta correlación entre estos patrones de afectación molecular de la hematopoyesis y algunas variantes clínicas de la enfermedad. Así, dentro de las SM típicas, la mutación multilíneal de *KIT* se detecta en prácticamente el 100% de las formas avanzadas (excepto en las SM-AHNMD), en el 30% de las ISMs+ y en el 8% de las ISMs- asociadas a anafilaxia por causas diferentes a picadura de insectos, estando prácticamente ausente en la ISMs- asociada a anafilaxia desencadenada únicamente por insectos. Respecto a los pacientes con WDSM que presentan mutación de *KIT* (~30% de los casos), no se han descrito casos con mutaciones en el exón 17 y afectación multilíneal de la hematopoyesis, mientras que en la mayoría de pacientes con mutaciones fuera del dominio catalítico de *KIT*, que representan 15-20% de las WDSM, éstas son de naturaleza germinal, lo que determinaría un mayor riesgo de progresión a formas avanzadas de la enfermedad y una tendencia a la agregación familiar en estos casos. Sin embargo, dada la posibilidad de respuesta a imatinib cuando la mutación afecta a los dominios transmembrana o yuxtamembrana de *KIT*, el pronóstico real de estos pacientes no es, en principio, equiparable al de los casos asociados a mutación multilíneal D816V de *KIT*.

Finalmente, la ausencia de mutaciones de *KIT* es en general excepcional en la SM, excepto en la SM asociada a SHE o CEL que habitualmente presentan reordenamiento de los genes *PDGFR4* o *PDGFRB*, y en la WDSM, en la que la frecuencia de detección de *KIT* silvestre es muy elevada (~70% de los casos). La probabilidad de respuesta a imatinib en SM sin mutación de *KIT* varía entre 25% y 100% de los casos, dependiendo de la ausencia o presencia de alteraciones de los genes *PDGFR4* o *PDGFRB*, respectivamente.

4.4.2. MAYOR EFICIENCIA EN IDENTIFICACIÓN DE PACIENTES CON PATOLOGÍA MASTOCITARIA DE NATURALEZA CLONAL

En la **FIGURA 18** se recoge de forma gráfica el número de pacientes derivados a la REMA entre enero de 1999 y diciembre de 2016 ($n=1016$) debido a la presencia de síntomas sugestivos de liberación de mediadores mastocitarios, en ausencia de afectación cutánea característica de mastocitosis. En ella podemos observar el incremento gradual del número casos evaluados por la REMA en la última década que refleja, por un lado, una mayor concienciación entre los profesionales de la salud que inicialmente atienden a este tipo de pacientes sobre la posible existencia de una ISMs- subyacente y, por otra parte, la necesidad de disponer de estrategias dirigidas a discriminar entre pacientes con una alta probabilidad de padecer la enfermedad y aquellos en los que esta probabilidad es baja, con el fin de realizar una selección racional de aquellos casos en los que es recomendable el estudio de MO.

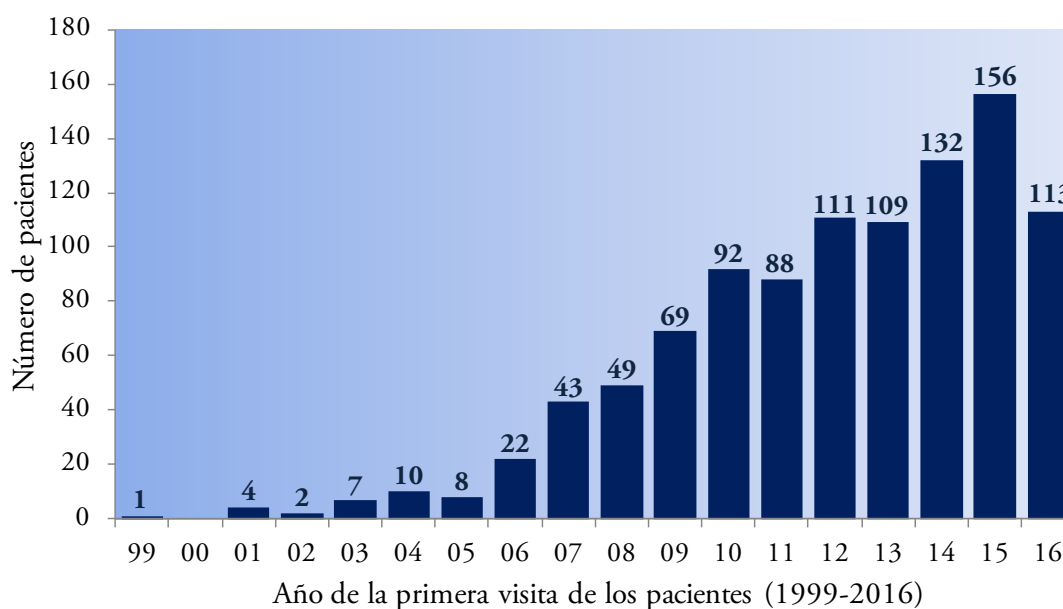


FIGURA 18. Pacientes con síntomas de liberación de mediadores mastocitarios en ausencia de afectación cutánea evaluados por la REMA entre enero de 1999 y diciembre de 2016.

En este sentido, la incorporación del *score* de la REMA a la práctica clínica diaria a raíz de su validación prospectiva ha permitido, no solo reducir en 7% el número de estu-

dios de MO realizados en pacientes derivados a la REMA por sospecha de ISMs-, sino también incrementar en 14% el porcentaje de estudios de MO con diagnóstico de ISMs- o MMAS *vs.* nc-MCAS (**FIGURA 19**).

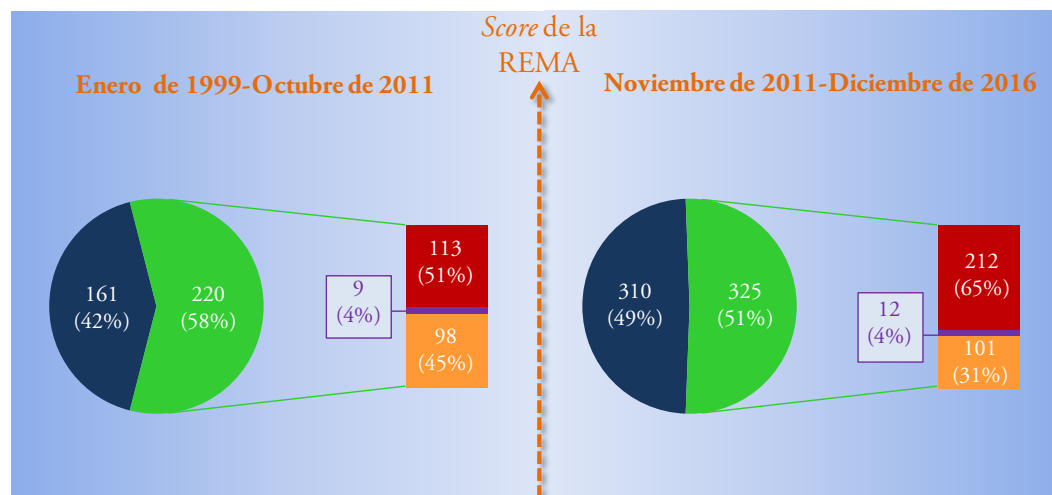


FIGURA 19. Estudios de médula ósea realizados y su correspondiente diagnóstico en pacientes con síntomas de liberación de mediadores mastocitarios en ausencia de afectación cutánea evaluados por la REMA antes y después de la validación del *score* de la REMA.

- Pacientes en los que no se realizó estudio de MO
- Pacientes en los que se realizó estudio de MO
- ISMs-
- MMAS
- nc-MCAS

Dado que una de las principales limitaciones inherentes al proceso diagnóstico de la ISMs- es la (relativamente frecuente) ausencia de sospecha clínica en aquellos pacientes que presentan niveles normales de triptasa sérica, una cuestión a dilucidar es si el *score* de la REMA mantiene su eficiencia en este grupo de pacientes. Así, si consideramos únicamente los pacientes con niveles normales de triptasa sérica ($<11.5 \mu\text{g/L}$) derivados a la REMA entre enero de 1999 y diciembre de 2016 ($n=249$), observamos que entre los pacientes sometidos a estudio medular, el diagnóstico de ISMs- o MMAS ha pasado del 35% al 68% desde que se aplica sistemáticamente el *score* de la REMA; si tenemos en cuenta que en el mismo periodo la frecuencia con la que se realizaron estudios de MO desde la validación del *score* se ha incrementado en un 17%, podemos concluir que el porcentaje global de pacientes con triptasa normal diagnosticados de patología mastocitaria

clonal se ha triplicado desde que el *score* de la REMA se aplica de manera rutinaria (9% vs. 30%) (FIGURA 20).

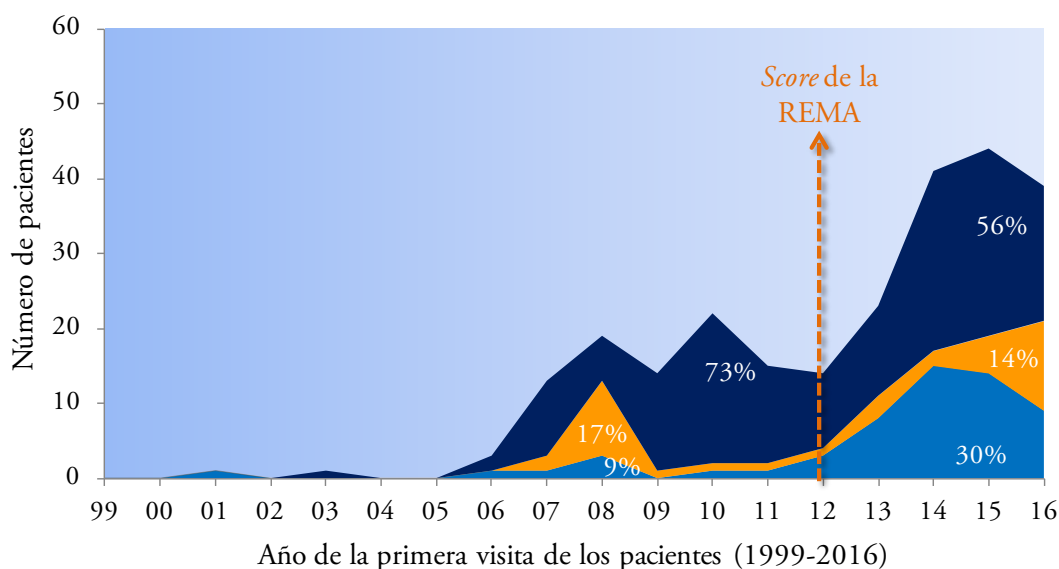


FIGURA 20. Número de pacientes en los que no se realizó estudio de MO y número de pacientes con diagnóstico de nc-MCAS y c-MCAS (ISMs- y MMAS) entre los pacientes con síntomas de liberación de mediadores mastocitarios sin afectación cutánea y niveles de triptasa sérica normales ($\leq 11.5 \mu\text{g/L}$) evaluados en la REMA antes y después de la validación del *score* de la REMA.

■ Estudios de MO no realizados
 ■ nc-MCAS
 ■ MMAS o ISMs-

Por último, cabe señalar que, en general, se considera que en ausencia de lesión cutánea característica de mastocitosis, cuanto mayor sea el valor de la triptasa sérica en el contexto de un cuadro clínico caracterizado por síntomas sugestivos de activación mastocitaria, mayor será la probabilidad de ISMs-. En este sentido, la única excepción a la aplicación sistemática del *score* de la REMA en pacientes derivados a la REMA desde que el modelo predictivo fue validado, es precisamente la demostración de niveles de triptasa sérica de al menos el doble del valor establecido como criterio menor de SM ($>40 \mu\text{g/L}$); de esta forma, todos los pacientes con niveles de triptasa $>40 \mu\text{g/L}$ evaluados por la REMA han sido sometidos a un estudio de MO independientemente de la puntuación obtenida al aplicar el *score* de la REMA. Globalmente, de los 86 pacientes con estas características evaluados por la REMA entre enero de 1999 y diciembre de 2016, el estudio de la MO ha confirmado la existencia de patología mastocitaria clonal en 69 casos (80%),

entre los que se incluyen 68 pacientes que cumplían criterios de SM (ISMs-) y un MMAS, presentando la inmensa mayoría de ellos (93%) un *score* de la REMA ≥ 2 . Por el contrario, de los 17 pacientes restantes en los que se descartó patología mastocitaria clonal tras el estudio medular, el 71% presentaban un *score* de la REMA < 2 . Estos resultados se traducen en una sensibilidad y especificidad del *score* de la REMA, aplicado de forma específica a este grupo de pacientes con niveles de triptasa sérica $> 40 \mu\text{g/L}$, muy similares a las descritas previamente en este trabajo doctoral, independientemente de los niveles de triptasa (**TABLA 9**).

Estas observaciones realizadas sobre la serie actualizada de la REMA de pacientes con síntomas de activación mastocitaria en ausencia de lesión cutánea, no solo confirman los estudios previos que forman parte de esta tesis doctoral en cuanto a la eficiencia global del modelo desarrollado para predecir patología mastocitaria clonal, sino que además demuestran que dicha eficiencia es independiente de los niveles de triptasa sérica. Cabe mencionar que la utilidad del *score* de la REMA como herramienta predictiva de ISMs- ha sido también reconocida a nivel internacional, como demuestra su incorporación dentro del algoritmo diagnóstico para pacientes con sospecha de ISMs- recomendado actualmente por la ECNM (470).

4.4.3. IMPACTO SOCIOECONÓMICO DERIVADO DE LA APLICACIÓN DEL SCORE DE LA REMA

Una consecuencia evidente de la incorporación del *score* de la REMA a la práctica clínica diaria ha sido la reducción significativa del número de estudios de MO realizados. A modo de ejemplo, considerando únicamente los pacientes con niveles incrementados ($> 11.5 \mu\text{g/L}$) de triptasa sérica derivados entre enero de 1999 y diciembre de 2016 a la REMA por sospecha de ISMs- ($n=767$), el porcentaje de casos en los que finalmente no se realizó el estudio medular ha pasado del 33% al 46% desde la validación del *score* de la REMA, permaneciendo similar la frecuencia relativa de pacientes diagnosticados de c-MCAS (ISMs- o MMAS) (39% *vs.* 37%) (**FIGURA 21**); esto ha supuesto (en este periodo) un ahorro directo de más de 250.000 Euros (**TABLA 11**).

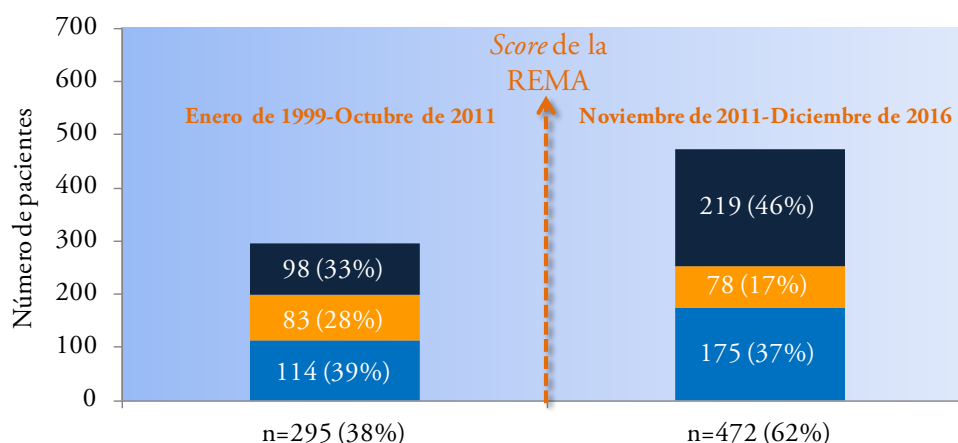


FIGURA 21. Número y frecuencia relativa de estudios de MO no realizados *vs.* estudios de MO con diagnóstico de nc-MCAS y c-MCAS (ISMs- y MMAS) en pacientes con síntomas de liberación de mediadores mastocitarios en ausencia de afectación cutánea asociado a niveles de triptasa sérica elevados (>11.5 µg/L) evaluados en la REMA antes y después de la validación del *score* de la REMA.

■ Estudios de MO no realizados
 ■ nc-MCAS
 ■ MMAS o ISMs-

TABLA 11. Ahorro económico estimado como consecuencia de la aplicación del *score* de la REMA* en pacientes con síntomas de liberación de mediadores mastocitarios sin afectación cutánea y triptasa sérica elevada (>11.5 µg/L).

AÑO	PACIENTES CON sT>11.5 µg/L	ESTUDIOS DE MO NO REALIZADOS	COSTE POR ESTUDIO DE MO‡	AHORRO ESTIMADO
2011	7	1	1.109,11 €	1.109,11 €
2012	87	45	1.175,66 €	52.904,70 €
2013	91	38	1.247,26 €	47.395,88 €
2014	91	41	1.247,26 €	51.137,66 €
2015	123	55	1.247,26 €	68.599,30 €
2016	73	39	1.247,26 €	48.643,14 €
Total	472	219		269.789,79 €

REMA, Red Española de Mastocitosis; sT, triptasa sérica; MO, médula ósea.

*Considerado desde la fecha de publicación del estudio de validación prospectiva del *score* de la REMA (28 de noviembre de 2011).

‡Tarifas establecidas por el Servicio de Salud de Castilla La Mancha (SESCAM).

4.4.4. IMPACTO EN LA TOMA DE DECISIONES TERAPÉUTICAS EN PACIENTES CON NUEVAS VARIANTES CLÍNICAS Y MOLECULARES DE MASTOCITOSIS

Teniendo en cuenta que el riesgo de progresión clínica de pacientes con ISM está íntimamente relacionado con la presencia y grado de afectación multilineal de la hematopoyesis por la mutación de *KIT*, y que ésta es muy poco frecuente entre los pacientes con ISMs-, se puede concluir que la probabilidad de que éstos requieran en algún momento tratamiento citorreductor es muy baja; esto es especialmente cierto en pacientes con ISMs- cuando los síntomas son desencadenados (exclusivamente) por insectos, en los que la mutación de *KIT* está restringida al compartimento mastocitario en prácticamente todos los casos. Por otro lado, la capacidad del *score* de la REMA para predecir la existencia de una ISMs- subyacente en pacientes con alergia a himenópteros, incluyendo aquellos que presentan niveles normales de triptasa sérica, permite mejorar la identificación de aquellos sujetos que finalmente serán diagnosticados de mastocitosis tras el estudio de MO correspondiente y que, por tanto, requerirán continuar con la inmunoterapia de manera indefinida debido al riesgo de desprotección frente a repicaduras si ésta se suspendiera (438). Además, el diagnóstico de ISMs- en pacientes con anafilaxia por himenópteros que presentan un estudio alérgico (convencional) negativo, justificaría el estudio de anticuerpos dirigidos frente a antígenos nativos, ya que en dos de cada tres de estos casos es posible establecer un mecanismo mediado por IgE mediante este método, brindando así la posibilidad de que puedan beneficiarse de la desensibilización mediante inmunoterapia específica.

El riesgo de progresión clínica y, por tanto, la necesidad de tratamiento citorreductor en pacientes con WDSM, es menos conocido debido al escaso número de pacientes con esta variante de SM y a que, en muchos de ellos, no es posible determinar el patrón de afectación molecular de la hematopoyesis al carecer de mutaciones de *KIT*. Basado en las características clínicas de los 33 pacientes con WDSM evaluados por la REMA e incluidos en esta tesis doctoral, y las de otros 6 casos publicados en la literatura que cumplen los criterios diagnósticos de WDSM propuestos (194,196–199), podemos concluir que uno

de cada cuatro pacientes con WDSM presenta ya una forma avanzada de la enfermedad en el momento del diagnóstico, siendo por tanto candidatos a recibir tratamiento citorreductor. Sin embargo, dada la limitación de los criterios diagnósticos actuales de la OMS para SM a la hora de identificar esta variante de SM, especialmente cuando se asocia a una carga mastocitaria baja, es probable que muchos de estos pacientes sean clasificados incorrectamente como CM, lo que dificulta una adecuada evaluación diagnóstica y pronóstica de los mismos. De cualquier forma, la presencia de mutación multilíneal de *KIT* en pacientes con WDSM se ha asociado también con formas avanzadas de la enfermedad, al igual que ocurre con las SM típicas con mutación D816V de *KIT*, lo que apoya la utilidad del estudio molecular de las diferentes poblaciones celulares hematopoyéticas en todas las WDSM en las que se detecten dichas mutaciones. Este tipo de estudio sería particularmente relevante en los estadios iniciales de la enfermedad, con el fin de identificar precozmente aquellos pacientes en riesgo de progresión clínica.

El carácter multilíneal de las mutaciones de *KIT* en pacientes con WDSM está además estrechamente relacionado con la existencia de mutaciones fuera del dominio catalítico del receptor, ya que cuando afectan a los dominios yuxtamembrana y transmembrana son sensibles a imatinib. Por lo tanto, se puede afirmar que las formas avanzadas de WDSM tienen, en general, un mejor pronóstico global que la SM típica, puesto que muchas de ellas serían susceptibles de ser tratadas eficazmente con terapias dirigidas. Todo ello indica la importancia de la secuenciación completa del gen *KIT* en las WDSM en las que no se detecten mutaciones en el exón 17 de este gen. Por otro lado, el 70% de los pacientes con WDSM carecen de mutación de *KIT*, y algunos de ellos presentan también formas avanzadas de la enfermedad. En estos casos, la probabilidad de alcanzar una respuesta significativa en términos de citorreducción con imatinib es baja, por lo que previsiblemente estos pacientes requerirán de terapias alternativas. En este sentido, el tratamiento con gemtuzumab-ozogamicina ha demostrado ser tremendamente eficaz en una paciente con WDSM de muy mal pronóstico, lo cual, dado el mecanismo de acción del fármaco, amplía el arsenal terapéutico no solo para pacientes con WDSM avanzadas sin mutaciones sensibles a imatinib, sino también para formas avanzadas de SM típica, incluyendo las asociadas a mutaciones en el exón 17 de *KIT*.

5. CAPÍTULO QUINTO

CONCLUSIONES

EN RELACIÓN CON LA IDENTIFICACIÓN DE FACTORES PRONÓSTICOS EN LA MASTOCITOSIS SISTÉMICA INDOLENTE:

1. El patrón de afectación de la hematopoyesis por la mutación de *KIT* al diagnóstico permite clasificar desde el punto de vista pronóstico a los pacientes con formas indolentes de SM; así, mientras que la presencia de mutación multilíneal de *KIT* refleja la afectación de un mayor número de precursores hematopoyéticos tempranos y determina un riesgo elevado de progresión a formas avanzadas de la enfermedad que requerirán tratamiento citorreductor, la mutación restringida al MC se asocia a un riesgo de progresión prácticamente nulo.
2. Los principales factores que influyen en la mortalidad de los pacientes con ISM son la edad avanzada, la presencia de niveles séricos incrementados de fosfatasa alcalina al diagnóstico y la progresión a SM-AHNMD, lo que indica de forma indirecta que la presencia de mutación multilíneal de *KIT* como factor pronóstico independiente asociado a progresión en pacientes con ISM, influiría también negativamente en la supervivencia.

EN RELACIÓN CON LAS CARACTERÍSTICAS DE LA MASTOCITOSIS SISTÉMICA SIN LESIÓN CUTÁNEA ASOCIADA A ANAFILAXIA (ISM_s-) Y SUS IMPLICACIONES PRONÓSTICAS Y TERAPÉUTICAS:

3. La ISM_s- representa un subtipo de SM caracterizado por síntomas graves relacionados con la liberación de mediadores mastocitarios en ausencia de afectación cutánea, con una baja carga mastocitaria asociada a una baja probabilidad de progresión a formas avanzadas de la enfermedad, cuyo diagnóstico requiere de la aplicación de técnicas moleculares y de citometría de flujo multiparamétrica altamente sensibles.
4. El *score* de la REMA para rastreo diagnóstico de MCAS constituye una herramienta relativamente simple y barata, que permite predecir con alta eficiencia el diagnóstico de ISM_s- y MMAS, y así seleccionar a qué pacientes con MCAS debe realizarse estu-

dio de MO. Este modelo predictivo, no solo facilita la identificación de pacientes con ISMs- y MMAS que presentan valores bajos (incluso normales) de triptasa sérica, sino que además tiene un impacto económico significativo como consecuencia del ahorro generado por los estudios de MO no realizados en pacientes que presentan una puntuación asociada a una baja probabilidad de patología mastocitaria clonal.

5. La ISMs- asociada a anafilaxia desencadenada (exclusivamente) por insectos constituye una variante única de ISMs- caracterizada por un predominio en el sexo masculino, por presentar una carga mastocitaria especialmente baja y por estar asociada a mutación de *KIT* restringida al MC, lo que determina que sea el subtipo de SM con menor riesgo de progresión a formas avanzadas de la enfermedad.
6. En dos terceras partes de los pacientes con ISMs- asociada a anafilaxia por picadura de himenópteros que presentan pruebas cutáneas negativas en ausencia de anticuerpos circulantes dirigidos contra el extracto completo del veneno del himenóptero involucrado, es posible demostrar sensibilización al mismo mediante la detección de anticuerpos dirigidos frente a antígenos nativos del veneno. La demostración mediante este método de un mecanismo patogénico de anafilaxia mediado por IgE permite a estos pacientes optar a terapia de desensibilización mediante inmunoterapia específica, que no estaría indicada según el estudio de alergia convencional.

EN RELACIÓN CON LAS CARACTERÍSTICAS DE LA MASTOCITOSIS SISTÉMICA BIEN DIFERENCIADA (WDSM) Y SUS IMPLICACIONES PRONÓSTICAS Y TERAPÉUTICAS:

7. La WDSM constituye una variante biológica rara de SM con características únicas, cuyo diagnóstico requiere de la aplicación de criterios clínicos, histológicos, citológicos, inmunofenotípicos y moleculares específicos, complementarios a los criterios diagnósticos actuales de la OMS para SM.

8. La reducción de la carga tumoral mastocitaria de pacientes con SM en respuesta al tratamiento con imatinib depende fundamentalmente de la existencia de mutaciones en los dominios transmembrana y yuxtamembrana de *KIT* (o de reordenamientos de los genes *PDGFR α* y *PDGFR β*) más que de la ausencia de la mutación D816V de *KIT* como se había sugerido previamente. Dado que la demostración de mutaciones en los dominios transmembrana y yuxtamembrana de *KIT* está íntimamente relacionada con el diagnóstico de WDSM, ésta constituye una de las variantes de SM con mayor probabilidad de respuesta a imatinib.
9. Resultados preliminares obtenidos en una paciente con MCI_{WD} sugieren que el tratamiento con gemtuzumab-ozogamicina podría constituir en el futuro una alternativa terapéutica eficaz y segura para pacientes con formas avanzadas de WDSM (y posiblemente SM típicas) sin mutaciones de *KIT* sensibles a imatinib; no obstante, es necesario llevar a cabo ensayos clínicos que confirmen esta posibilidad.

6. CAPÍTULO SEXTO

BIBLIOGRAFÍA

1. Ehrlich P. Beiträge zur Theorie und Praxis der histologischen Färbung. Leipzig University; 1878.
2. Valent P, Horny H-P, Li CY, Longley JB, Metcalfe DD, Parwaresch RM *et al.* Mastocytosis (Mast cell disease). En: Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW, editores. World Health Organization (WHO) Classification of Tumours. Pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: IARC Press; 2001;1:291-302.
3. Kitamura Y, Yokoyama M, Matsuda H, Ohno T. Spleen colony forming cell as a common precursor for tissue mast cells and granulocytes. *Nature*. 1981;291:159–60.
4. Kirshenbaum AS, Kessler SW, Goff JP, Metcalfe DD. Demonstration of the origin of human mast cells from CD34+ bone marrow progenitor cells. *J Immunol*. 1991;146:1410–5.
5. Agis H, Willheim M, Sperr WR, Wilfing A, Krömer E, Kabrna E, *et al.* Monocytes do not make mast cells when cultured in the presence of SCF. Characterization of the circulating mast cell progenitor as a c-kit+, CD34+, Ly-, CD14-, CD17-, colony- forming cell. *J Immunol*. 1993;151:4221–7.
6. Rottem M, Okada T, Goff JP, Metcalfe DD. Mast cells cultured from the peripheral blood of normal donors and patients with mastocytosis originate from a CD34+/Fc epsilon RI- cell population. *Blood*. 1994;84(8):2489–96.
7. Kitamura Y, Ito A. Mast cell-committed progenitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Aug 9;102(32):11129–30.
8. Kitamura Y. Heterogeneity of mast cells and phenotypic change between subpopulations. *Annu Rev Immunol*. 1989;7:59–76.
9. Valent P, Spanblöchl E, Sperr WR, Sillaber C, Zsebo KM, Agis H, *et al.* Induction of differentiation of human mast cells from bone marrow and peripheral blood mononuclear cells by recombinant human stem cell factor/_kit_-ligand in long-term culture. *Blood*. 1992;80:2237–45.
10. Gurish MF, Austen KF. The diverse roles of mast cells. *J Exp Med*. 2001;194(1):F1–5.
11. Mekori YA. The mastocyte: the “other” inflammatory cell in immunopathogenesis. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;114(1):52–7.
12. Crivellato E, Ribatti D. Involvement of mast cells in angiogenesis and chronic inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. 2005;4(1):9–11.
13. Tkaczyk C, Jensen BM, Iwaki S, Gilfillan AM. Adaptive and innate immune reactions regulating mast cell activation: from receptor-mediated signaling to responses. *Immunol Allergy ClinNorth Am*. 2006;26(3):427–50.

14. Rao KN, Brown MA. Mast cells: multifaceted immune cells with diverse roles in health and disease. *Ann NY Acad Sci.* 2008;1143:83–104.
15. Church MK, Levi-Schaffer F. The human mast cell. *J Allergy Clin Immunol.* 1997;99(2):155–60.
16. Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol.* 2001;2(8):675–80.
17. Takeuchi O, Sato S, Horiuchi T, Hoshino K, Takeda K, Dong Z, *et al.* Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J Immunol.* 2002;169(1):10–4.
18. Malaviya R, Gao Z, Thankavel K, van der Merwe PA, Abraham SN. The mast cell tumor necrosis factor alpha response to FimH-expressing *Escherichia coli* is mediated by the glycosylphosphatidylinositol-anchored molecule CD48. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(14):8110–5.
19. Féger F, Ribadeau Dumas A, Leriche L, Valent P, Arock M. Kit and c-kit mutations in mastocytosis: a short overview with special reference to novel molecular and diagnostic concepts. *Int Arch Allergy Immunol.* 2002;127(2):110–4.
20. Muñoz S, Hernández-Pando R, Abraham SN, Enciso JA. Mast cell activation by *Mycobacterium tuberculosis*: mediator release and role of CD48. *J Immunol.* 2003;170(11):5590–6.
21. Zwirner J, Götze O, Sieber A, Kapp A, Begemann G, Zuberbier T, *et al.* The human mast cell line HMC-1 binds and responds to C3a but not C3a(desArg). *Scand J Immunol.* 1998;47(1):19–24.
22. Okayama Y, Kirshenbaum AS, Metcalfe DD. Expression of a functional high-affinity IgG receptor, Fc gamma RI, on human mast cells: Up-regulation by IFN-gamma. *J Immunol.* 2000;164(8):4332–9.
23. Woolhiser MR, Brockow K, Metcalfe DD. Activation of human mast cells by aggregated IgG through Fc gamma RI: additive effects of C3a. *Clin Immunol.* 2004;110(2):172–80.
24. Malaviya R, Ross EA, MacGregor JI, Ikeda T, Little JR, Jakschik BA, *et al.* Mast cell phagocytosis of FimH-expressing enterobacteria. *J Immunol.* 1994;152(4):1907–14.
25. Di Nardo A, Vitiello A, Gallo RL. Cutting edge: mast cell antimicrobial activity is mediated by expression of cathelicidin antimicrobial peptide. *J Immunol.* 2003;170(5):2274–8.
26. Pecht I, Corcia A. Stimulus-secretion coupling mechanisms in mast cells. *Biophys Chem.* 1987;26(2-3):291–301.
27. Kinet JP. The high-affinity IgE receptor (Fc epsilon RI): from physiology to pathology. *Annu Rev Immunol.* 1999;17:931–72.

28. Woolley DE, Tetlow LC. Mast cell activation and its relation to proinflammatory cytokine production in the rheumatoid lesion. *Arthritis Res.* 2000;2(1):65–74.
29. Lee DM, Friend DS, Gurish MF, Benoist C, Mathis D, Brenner MB. Mast cells: a cellular link between autoantibodies and inflammatory arthritis. *Science.* 2002;297(5587):1689–92.
30. Gruber BL. Mast cells in scleroderma. *Clin Dermatol.* 1994;12(3):397–406.
31. Ozbilgin MK, Inan S. The roles of transforming growth factor type beta3 (TGF-beta3) and mast cells in the pathogenesis of scleroderma. *Clin Rheumatol.* 2003;22(3):189–95.
32. Lynes WL, Flynn SD, Shortliffe LD, Lemmers M, Zipser R, Roberts LJ, *et al.* Mast cell involvement in interstitial cystitis. *J Urol.* 1987;138(4):746–52.
33. Feltis JT, Perez-Marrero R, Emerson LE. Increased mast cells of the bladder in suspected cases of interstitial cystitis: a possible disease marker. *J Urol.* 1987;138(1):42–3.
34. Lundeberg T, Liedberg H, Nordling L, Theodorsson E, Owzarski A, Ekman P. Interstitial cystitis: correlation with nerve fibres, mast cells and histamine. *Br J Urol.* 1993;71(4):427–9.
35. Theoharides TC, Sant GR, el-Mansoury M, Letourneau R, Ucci AA, Meares EM. Activation of bladder mast cells in interstitial cystitis: a light and electron microscopic study. *J Urol.* 1995;153(3 Pt 1):629–36.
36. Krüger PG, Bø L, Myhr KM, Karlsen AE, Taule A, Nyland HI, *et al.* Mast cells and multiple sclerosis: a light and electron microscopic study of mast cells in multiple sclerosis emphasizing staining procedures. *Acta Neurol Scand.* 1990;81(1):31–6.
37. Walker ME, Hatfield JK, Brown MA. New insights into the role of mast cells in autoimmunity: evidence for a common mechanism of action? *Biochim Biophys Acta.* 2012;1822(1):57–65.
38. Weston AP, Biddle WL, Bhatia PS, Miner PB. Terminal ileal mucosal mast cells in irritable bowel syndrome. *Dig Dis Sci.* 1993;38(9):1590–5.
39. O’Sullivan M, Clayton N, Breslin NP, Harman I, Bountra C, McLaren A, *et al.* Increased mast cells in the irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol Motil Off J Eur Gastrointest Motil Soc.* 2000;12(5):449–57.
40. Vivinus-Nébot M, Dainese R, Anty R, Saint-Paul MC, Nano JL, Gonthier N, *et al.* Combination of allergic factors can worsen diarrheic irritable bowel syndrome: role of barrier defects and mast cells. *Am J Gastroenterol.* 2012;107(1):75–81.
41. Theoharides TC. Mast cells in irritable bowel syndrome and ulcerative colitis: function not numbers is what makes all the difference. *Dig Dis Sci.* 2014;59(5):897–8.

42. Trabucchi E, Radaelli E, Marazzi M, Foschi D, Musazzi M, Veronesi AM, *et al.* The role of mast cells in wound healing. *Int J Tissue React.* 1988;10(6):367–72.
43. Levi-Schaffer F, Kupietzky A. Mast cells enhance migration and proliferation of fibroblasts into an in vitro wound. *Exp Cell Res.* 1990;188(1):42–9.
44. Noli C, Miolo A. The mast cell in wound healing. *Vet Dermatol.* 2001;12(6):303–13.
45. Coussens LM, Raymond WW, Bergers G, Laig-Webster M, Behrendtsen O, Werb Z, *et al.* Inflammatory mast cells up-regulate angiogenesis during squamous epithelial carcinogenesis. *Genes Dev.* 1999;13(11):1382–97.
46. de Souza DA, Borges AC, Santana AC, Oliver C, Jamur MC. Mast Cell Proteases 6 and 7 Stimulate Angiogenesis by Inducing Endothelial Cells to Release Angiogenic Factors. *PloS One.* 2015;10(12):e0144081.
47. Galinsky DST, Nechushtan H. Mast cells and cancer--no longer just basic science. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2008;68(2):115–30.
48. Maltby S, Khazaie K, McNagny KM. Mast cells in tumor growth: angiogenesis, tissue remodelling and immune-modulation. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1796(1):19–26.
49. Okayama Y, Kawakami T. Development, migration, and survival of mast cells. *Immunol Res.* 2006;34(2):97–115.
50. Orfao A, Escribano L, Villarrubia J, Velasco JL, Cerveró C, Ciudad J, *et al.* Flow cytometric analysis of mast cells from normal and pathological human bone marrow samples: identification and enumeration. *Am J Pathol.* 1996;149(5):1493–9.
51. Escribano L, Orfao A, Villarrubia J, Díaz-Agustín B, Cerveró C, Rios A, *et al.* Immunophenotypic characterization of human bone marrow mast cells. A flow cytometric study of normal and pathological bone marrow samples. *Anal Cell Pathol J Eur Soc Anal Cell Pathol.* 1998;16(3):151–9.
52. Escribano L, Garcia Montero AC, Núñez R, Orfao A; Red Española de Mastocitosis. Flow cytometric analysis of normal and neoplastic mast cells: role in diagnosis and follow-up of mast cell disease. *Immunol Allergy Clin North Am.* 2006;26(3):535–47.
53. Irani AA, Schechter NM, Craig SS, DeBlois G, Schwartz LB. Two types of human mast cells that have distinct neutral protease compositions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986;83(12):4464–8.
54. Weidner N, Austen KF. Heterogeneity of mast cells at multiple body sites. Fluorescent determination of avidin binding and immunofluorescent determination of chymase, tryptase, and carboxypeptidase content. *Pathol Res Pract.* 1993;189(2):156–62.

55. Bradding P, Okayama Y, Howarth PH, Church MK, Holgate ST. Heterogeneity of human mast cells based on cytokine content. *J Immunol.* 1995;155(1):297–307.
56. Oskeritzian CA, Zhao W, Min H-K, Xia H-Z, Pozez A, Kiev J, *et al.* Surface CD88 functionally distinguishes the MCTC from the MCT type of human lung mast cell. *J Allergy Clin Immunol.* 2005;115(6):1162–8.
57. Friend DS, Ghildyal N, Austen KF, Gurish MF, Matsumoto R, Stevens RL. Mast cells that reside at different locations in the jejunum of mice infected with *Trichinella spiralis* exhibit sequential changes in their granule ultrastructure and chymase phenotype. *J Cell Biol.* 1996;135(1):279–90.
58. Kirshenbaum AS, Goff JP, Semere T, Foster B, Scott LM, Metcalfe DD. Demonstration that human mast cells arise from a progenitor cell population that is CD34(+), c-kit(+), and expresses aminopeptidase N (CD13). *Blood.* 1999;94(7):2333–42.
59. Shimizu Y, Sakai K, Miura T, Narita T, Tsukagoshi H, Satoh Y, *et al.* Characterization of “adult-type” mast cells derived from human bone marrow CD34(+) cells cultured in the presence of stem cell factor and interleukin-6. Interleukin-4 is not required for constitutive expression of CD54, Fc epsilon RI alpha and chymase, and CD13 expression is reduced during differentiation. *Clin Exp Allergy.* 2002;32(6):872–80.
60. Yokoi H, Myers A, Matsumoto K, Crocker PR, Saito H, Bochner BS. Alteration and acquisition of Siglecs during in vitro maturation of CD34+ progenitors into human mast cells. *Allergy.* 2006;61(6):769–76.
61. Scherthaner G-H, Hauswirth AW, Baghestanian M, Agis H, Ghannadan M, Worda C, *et al.* Detection of differentiation- and activation-linked cell surface antigens on cultured mast cell progenitors. *Allergy.* 2005;60(10):1248–55.
62. Díaz-Agustín B, Escribano L, Bravo P, Herrero S, Nuñez R, Navalón R, *et al.* The CD69 early activation molecule is overexpressed in human bone marrow mast cells from adults with indolent systemic mast cell disease. *Br J Haematol.* 1999;106(2):400–5.
63. Frandji P, Oskéritzian C, Cacaraci F, Lapeyre J, Peronet R, David B, *et al.* Antigen-dependent stimulation by bone marrow-derived mast cells of MHC class II-restricted T cell hybridoma. *J Immunol.* 1993;151(11):6318–28.
64. Morgado JM, Sánchez-Muñoz L, Teodósio C, Escribano L. Identification and immunophenotypic characterization of normal and pathological mast cells. *Methods Mol Biol.* 2014;1192:205–26.
65. Teodosio C, Mayado A, Sánchez-Muñoz L, Morgado JM, Jara-Acevedo M, Álvarez-Twose I, *et al.* The immunophenotype of mast cells and its utility in the diagnostic work-up of systemic mastocytosis. *J Leukoc Biol.* 2015;97(1):49–59.

66. Gane P, Pecquet C, Crespeau H, Lambin P, Leynadier F, Rouger P. Flow cytometric monitoring of allergen induced basophil activation. *Cytometry*. 1995;19(4):361–5.
67. Strohmeyer T, Peter S, Hartmann M, Munemitsu S, Ackermann R, Ullrich A, *et al.* Expression of the hst-1 and c-kit protooncogenes in human testicular germ cell tumors. *Cancer Res*. 1991;51(7):1811–6.
68. Halaban R, Tyrrell L, Longley J, Yarden Y, Rubin J. Pigmentation and proliferation of human melanocytes and the effects of melanocyte-stimulating hormone and ultraviolet B light. *Ann N Y Acad Sci*. 1993;680:290–301.
69. Simmons PJ, Aylett GW, Niutta S, To LB, Juttner CA, Ashman LK. c-kit is expressed by primitive human hematopoietic cells that give rise to colony-forming cells in stroma-dependent or cytokine-supplemented culture. *Exp Hematol*. 1994;22(2):157–65.
70. Huizinga JD, Thuneberg L, Klüppel M, Malysz J, Mikkelsen HB, Bernstein A. W/kit gene required for interstitial cells of Cajal and for intestinal pacemaker activity. *Nature*. 1995;373(6512):347–9.
71. Ashman LK. The biology of stem cell factor and its receptor C-kit. *Int J Biochem Cell Biol*. 1999;31(10):1037–51.
72. Kitamura Y, Go S, Hatanaka K. Decrease of mast cells in W/W^v mice and their increase by bone marrow transplantation. *Blood*. 1978;52(2):447–52.
73. Kitamura Y, Go S. Decreased production of mast cells in S1/S1d anemic mice. *Blood*. 1979;53(3):492–7.
74. Irani AM, Nilsson G, Miettinen U, Craig SS, Ashman LK, Ishizaka T, *et al.* Recombinant human stem cell factor stimulates differentiation of mast cells from dispersed human fetal liver cells. *Blood*. 1992;80(12):3009–21.
75. Galli SJ, Tsai M, Wershil BK, Tam SY, Costa JJ. Regulation of mouse and human mast cell development, survival and function by stem cell factor, the ligand for the c-kit receptor. *Int Arch Allergy Immunol*. 1995;107(1-3):51–3.
76. Lennartsson J, Jelacic T, Linnekin D, Shivakrupa R. Normal and oncogenic forms of the receptor tyrosine kinase kit. *Stem Cells*. 2005;23(1):16–43.
77. Kitamura Y, Oboki K, Ito A. Molecular mechanisms of mast cell development. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2006;26(3):387–405.
78. Yarden Y, Kuang WJ, Yang-Feng T, Coussens L, Munemitsu S, Dull TJ, *et al.* Human proto-oncogene c-kit: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand. *EMBO J*. 1987;6(11):3341–51.
79. Qiu FH, Ray P, Brown K, Barker PE, Jhanwar S, Ruddle FH, *et al.* Primary structure of c-kit: relationship with the CSF-1/PDGF receptor kinase family--oncogenic activation of v-kit involves deletion of extracellular domain and C terminus. *EMBO J*. 1988;7(4):1003–11.

80. Giebel LB, Strunk KM, Holmes SA, Spritz RA. Organization and nucleotide sequence of the human KIT (mast/stem cell growth factor receptor) proto-oncogene. *Oncogene*. 1992;7(11):2207–17.
81. Lev S, Blechman J, Nishikawa S, Givol D, Yarden Y. Interspecies molecular chimeras of kit help define the binding site of the stem cell factor. *Mol Cell Biol*. 1993;13(4):2224–34.
82. Lemmon MA, Pinchasi D, Zhou M, Lax I, Schlessinger J. Kit receptor dimerization is driven by bivalent binding of stem cell factor. *J Biol Chem*. 1997;272(10):6311–7.
83. Hubbard SR. Juxtamembrane autoinhibition in receptor tyrosine kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2004;5(6):464–71.
84. Mol CD, Dougan DR, Schneider TR, Skene RJ, Kraus ML, Scheibe DN, *et al*. Structural basis for the autoinhibition and STI-571 inhibition of c-Kit tyrosine kinase. *J Biol Chem*. 2004;279(30):31655–63.
85. Anderson DM, Williams DE, Tushinski R, Gimpel S, Eisenman J, Cannizzaro LA, *et al*. Alternate splicing of mRNAs encoding human mast cell growth factor and localization of the gene to chromosome 12q22-q24. *Cell Growth Differ*. 1991;2(8):373–8.
86. Blume-Jensen P, Claesson-Welsh L, Siegbahn A, Zsebo KM, Westermark B, Heldin CH. Activation of the human c-kit product by ligand-induced dimerization mediates circular actin reorganization and chemotaxis. *EMBO J*. 1991;10(13):4121–8.
87. Zhang Z, Zhang R, Joachimiak A, Schlessinger J, Kong XP. Crystal structure of human stem cell factor: implication for stem cell factor receptor dimerization and activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(14):7732–7.
88. Liu H, Chen X, Focia PJ, He X. Structural basis for stem cell factor-KIT signaling and activation of class III receptor tyrosine kinases. *EMBO J*. 2007;26(3):891–901.
89. Weiler SR, Mou S, DeBerry CS, Keller JR, Ruscetti FW, Ferris DK, *et al*. JAK2 is associated with the c-kit proto-oncogene product and is phosphorylated in response to stem cell factor. *Blood*. 1996;87(9):3688–93.
90. Linnekin D, Weiler SR, Mou S, DeBerry CS, Keller JR, Ruscetti FW, *et al*. JAK2 is constitutively associated with c-Kit and is phosphorylated in response to stem cell factor. *Acta Haematol*. 1996;95(3-4):224–8.
91. Deberry C, Mou S, Linnekin D. Stat1 associates with c-kit and is activated in response to stem cell factor. *Biochem J*. 1997;327 (Pt 1):73–80.
92. Brizzi MF, Dentelli P, Rosso A, Yarden Y, Pegoraro L. STAT protein recruitment and activation in c-Kit deletion mutants. *J Biol Chem*. 1999;274(24):16965–72.
93. Morales JK, Falanga YT, Depcrynski A, Fernando J, Ryan JJ. Mast cell homeostasis and the JAK-STAT pathway. *Genes Immun*. 2010;11(8):599–608.

94. Serve H, Yee NS, Stella G, Sepp-Lorenzino L, Tan JC, Besmer P. Differential roles of PI3-kinase and Kit tyrosine 821 in Kit receptor-mediated proliferation, survival and cell adhesion in mast cells. *EMBO J.* 1995;14(3):473–83.
95. Vosseller K, Stella G, Yee NS, Besmer P. c-kit receptor signaling through its phosphatidylinositol-3'-kinase-binding site and protein kinase C: role in mast cell enhancement of degranulation, adhesion, and membrane ruffling. *Mol Biol Cell.* 1997;8(5):909–22.
96. Kubota Y, Angelotti T, Niederfellner G, Herbst R, Ullrich A. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase is necessary for differentiation of FDC-P1 cells following stimulation of type III receptor tyrosine kinases. *Cell Growth Differ.* 1998;9(3):247–56.
97. Krystal GW, DeBerry CS, Linnekin D, Litz J. Lck associates with and is activated by Kit in a small cell lung cancer cell line: inhibition of SCF-mediated growth by the Src family kinase inhibitor PP1. *Cancer Res.* 1998;58(20):4660–6.
98. Ueda S, Mizuki M, Ikeda H, Tsujimura T, Matsumura I, Nakano K, *et al.* Critical roles of c-Kit tyrosine residues 567 and 719 in stem cell factor-induced chemotaxis: contribution of src family kinase and PI3-kinase on calcium mobilization and cell migration. *Blood.* 2002;99(9):3342–9.
99. Rönnstrand L. Signal transduction via the stem cell factor receptor/c-Kit. *Cell Mol Life Sci.* 2004;61(19-20):2535–48.
100. Miyazawa K, Toyama K, Gotoh A, Hendrie PC, Mantel C, Broxmeyer HE. Ligand-dependent polyubiquitination of c-kit gene product: a possible mechanism of receptor down modulation in M07e cells. *Blood.* 1994;83(1):137–45.
101. Yee NS, Hsiau CW, Serve H, Vosseller K, Besmer P. Mechanism of down-regulation of c-kit receptor. Roles of receptor tyrosine kinase, phosphatidylinositol 3'-kinase, and protein kinase C. *J Biol Chem.* 1994;269(50):31991–8.
102. Zadjali F, Pike ACW, Vesterlund M, Sun J, Wu C, Li SSC, *et al.* Structural basis for c-KIT inhibition by the suppressor of cytokine signaling 6 (SOCS6) ubiquitin ligase. *J Biol Chem.* 2011;286(1):480–90.
103. Kozlowski M, Larose L, Lee F, Le DM, Rottapel R, Siminovitch KA. SHP-1 binds and negatively modulates the c-Kit receptor by interaction with tyrosine 569 in the c-Kit juxtamembrane domain. *Mol Cell Biol.* 1998;18(4):2089–99.
104. Edling CE, Pedersen M, Carlsson L, Rönnstrand L, Palmer RH, Hallberg B. Haematopoietic progenitor cells utilise conventional PKC to suppress PKB/Akt activity in response to c-Kit stimulation. *Br J Haematol.* 2007;136(2):260–8.
105. Rottapel R, Ilangumaran S, Neale C, La Rose J, Ho JM-Y, Nguyen MH-H, *et al.* The tumor suppressor activity of SOCS-1. *Oncogene.* 2002;21(28):4351–62.
106. Yu Y, Blokhuis BR, Garssen J, Redegeld FA. Non-IgE mediated mast cell activation. *Eur J Pharmacol.* 2016;778:33–43.

107. Zhang D, Spielmann A, Wang L, Ding G, Huang F, Gu Q, *et al.* Mast-cell degranulation induced by physical stimuli involves the activation of transient-receptor-potential channel TRPV2. *Physiol Res.* 2012;61(1):113–24.
108. Blank U, Ra C, Miller L, White K, Metzger H, Kinet JP. Complete structure and expression in transfected cells of high affinity IgE receptor. *Nature.* 1989;337(6203):187–9.
109. Rivera J, Gilfillan AM. Molecular regulation of mast cell activation. *J Allergy Clin Immunol.* 2006;117(6):1214–25.
110. Kalesnikoff J, Galli SJ. New developments in mast cell biology. *Nat Immunol.* 2008;9(11):1215–23.
111. Katz HR. Inhibitory receptors and allergy. *Curr Opin Immunol.* 2002;14(6):698–704.
112. Volná P, Lebduska P, Dráberová L, Símová S, Heneberg P, Boubelík M, *et al.* Negative regulation of mast cell signaling and function by the adaptor LAB/NTAL. *J Exp Med.* 2004;200(8):1001–13.
113. Castells M. Mast cell mediators in allergic inflammation and mastocytosis. *Immunol Allergy Clin North Am.* 2006;26(3):465–85.
114. Ogawa Y, Grant JA. Mediators of anaphylaxis. *Immunol Allergy Clin North Am.* 2007;27(2):249–60.
115. Repka-Ramirez MS. New concepts of histamine receptors and actions. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2003;3(3):227–31.
116. O'Mahony L, Akdis M, Akdis CA. Regulation of the immune response and inflammation by histamine and histamine receptors. *J Allergy Clin Immunol.* 2011;128(6):1153–62.
117. Schwartz LB, Metcalfe DD, Miller JS, Earl H, Sullivan T. Tryptase levels as an indicator of mast-cell activation in systemic anaphylaxis and mastocytosis. *N Engl J Med.* 1987;316(26):1622–6.
118. Pejler G, Abrink M, Ringvall M, Wernersson S. Mast cell proteases. *Adv Immunol.* 2007;95:167–255.
119. Schwartz LB, Sakai K, Bradford TR, Ren S, Zweiman B, Worobec AS, *et al.* The alpha form of human tryptase is the predominant type present in blood at baseline in normal subjects and is elevated in those with systemic mastocytosis. *J Clin Invest.* 1995;96(6):2702–10.
120. Sperr WR, Jordan J-H, Fiegl M, Escribano L, Bellas C, Dirnhofer S, *et al.* Serum tryptase levels in patients with mastocytosis: correlation with mast cell burden and implication for defining the category of disease. *Int Arch Allergy Immunol.* 2002;128(2):136–41.

121. Savini P, Rondoni M, Poletti G, Lanzi A, Quercia O, Soverini S, *et al.* Serum total tryptase level confirms itself as a more reliable marker of mast cells burden in mast cell leukaemia (aleukaemic variant). *Case Rep Hematol.* 2015;2015:737302.
122. Schwartz LB. Diagnostic value of tryptase in anaphylaxis and mastocytosis. *Immunol Allergy Clin North Am.* 2006;26(3):451–63.
123. Schwartz LB, Bradford TR, Rouse C, Irani AM, Rasp G, Van der Zwan JK, *et al.* Development of a new, more sensitive immunoassay for human tryptase: use in systemic anaphylaxis. *J Clin Immunol.* 1994;14(3):190–204.
124. Johnson PR, Ammit AJ, Carlin SM, Armour CL, Caughey GH, Black JL. Mast cell tryptase potentiates histamine-induced contraction in human sensitized bronchus. *Eur Respir J.* 1997;10(1):38–43.
125. Caughey GH, Leidig F, Viro NF, Nadel JA. Substance P and vasoactive intestinal peptide degradation by mast cell tryptase and chymase. *J Pharmacol Exp Ther.* 1988;244(1):133–7.
126. Tam EK, Caughey GH. Degradation of airway neuropeptides by human lung tryptase. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1990;3(1):27–32.
127. Birkedal-Hansen H, Cobb CM, Taylor RE, Fullmer HM. Activation of fibroblast procollagenase by mast cell proteases. *Biochim Biophys Acta.* 1976;438(1):273–86.
128. Abe M, Kurosawa M, Ishikawa O, Miyachi Y, Kido H. Mast cell tryptase stimulates both human dermal fibroblast proliferation and type I collagen production. *Clin Exp Allergy.* 1998;28(12):1509–17.
129. Akers IA, Parsons M, Hill MR, Hollenberg MD, Sanjar S, Laurent GJ, *et al.* Mast cell tryptase stimulates human lung fibroblast proliferation via protease-activated receptor-2. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2000;278(1):L193–201.
130. Fukuoka Y, Xia H-Z, Sanchez-Muñoz LB, Dellinger AL, Escribano L, Schwartz LB. Generation of anaphylatoxins by human beta-tryptase from C3, C4, and C5. *J Immunol.* 2008;180(9):6307–16.
131. Imamura T, Dubin A, Moore W, Tanaka R, Travis J. Induction of vascular permeability enhancement by human tryptase: dependence on activation of prekallikrein and direct release of bradykinin from kininogens. *Lab Invest.* 1996;74(5):861–70.
132. Prieto-García A, Castells MC, Hansbro PM, Stevens RL. Mast cell-restricted tetramer-forming tryptases and their beneficial roles in hemostasis and blood coagulation. *Immunol Allergy Clin North Am.* 2014;34(2):263–81.
133. Walls AF, He S, Teran LM, Buckley MG, Jung KS, Holgate ST, *et al.* Granulocyte recruitment by human mast cell tryptase. *Int Arch Allergy Immunol.* 1995;107(1-3):372–3.

134. He S, Peng Q, Walls AF. Potent induction of a neutrophil and eosinophil-rich infiltrate in vivo by human mast cell tryptase: selective enhancement of eosinophil recruitment by histamine. *J Immunol.* 1997;159(12):6216–25.
135. Douaiher J, Succar J, Lancerotto L, Gurish MF, Orgill DP, Hamilton MJ, *et al.* Development of mast cells and importance of their tryptase and chymase serine proteases in inflammation and wound healing. *Adv Immunol.* 2014;122:211–52.
136. Blair RJ, Meng H, Marchese MJ, Ren S, Schwartz LB, Tonnesen MG, *et al.* Human mast cells stimulate vascular tube formation. Tryptase is a novel, potent angiogenic factor. *J Clin Invest.* 1997;99(11):2691–700.
137. Piliponsky AM, Chen C-C, Nishimura T, Metz M, Rios EJ, Dobner PR, *et al.* Neurotensin increases mortality and mast cells reduce neurotensin levels in a mouse model of sepsis. *Nat Med.* 2008;14(4):392–8.
138. Reilly CF, Tewksbury DA, Schechter NM, Travis J. Rapid conversion of angiotensin I to angiotensin II by neutrophil and mast cell proteinases. *J Biol Chem.* 1982;257(15):8619–22.
139. Jenne DE, Tschopp J. Angiotensin II-forming heart chymase is a mast-cell-specific enzyme. *Biochem J.* 1991;276 (Pt 2):567–8.
140. Miyazaki M, Takai S, Jin D, Muramatsu M. Pathological roles of angiotensin II produced by mast cell chymase and the effects of chymase inhibition in animal models. *Pharmacol Ther.* 2006;112(3):668–76.
141. Sommerhoff CP, Caughey GH, Finkbeiner WE, Lazarus SC, Basbaum CB, Nadel JA. Mast cell chymase. A potent secretagogue for airway gland serous cells. *J Immunol.* 1989;142(7):2450–6.
142. Kofford MW, Schwartz LB, Schechter NM, Yager DR, Diegelmann RF, Graham MF. Cleavage of type I procollagen by human mast cell chymase initiates collagen fibril formation and generates a unique carboxyl-terminal propeptide. *J Biol Chem.* 1997;272(11):7127–31.
143. Tchougounova E, Lundquist A, Fajardo I, Winberg J-O, Abrink M, Pejler G. A key role for mast cell chymase in the activation of pro-matrix metalloprotease-9 and pro-matrix metalloprotease-2. *J Biol Chem.* 2005;280(10):9291–6.
144. Caughey GH. Mast cell proteases as protective and inflammatory mediators. *Adv Exp Med Biol.* 2011;716:212–34.
145. Serafin WE, Katz HR, Austen KF, Stevens RL. Complexes of heparin proteoglycans, chondroitin sulfate E proteoglycans, and [3H]diisopropyl fluorophosphate-binding proteins are exocytosed from activated mouse bone marrow-derived mast cells. *J Biol Chem.* 1986;261(32):15017–21.
146. Rönnberg E, Melo FR, Pejler G. Mast cell proteoglycans. *J Histochem Cytochem.* 2012;60(12):950–62.

147. Fujishima H, Sanchez Mejia RO, Bingham CO, Lam BK, Sapirstein A, Bonventre JV, *et al.* Cytosolic phospholipase A2 is essential for both the immediate and the delayed phases of eicosanoid generation in mouse bone marrow-derived mast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(9):4803–7.
148. Nakatani N, Uozumi N, Kume K, Murakami M, Kudo I, Shimizu T. Role of cytosolic phospholipase A2 in the production of lipid mediators and histamine release in mouse bone-marrow-derived mast cells. *Biochem J.* 2000;352 Pt 2:311–7.
149. Schleimer RP, Fox CC, Naclerio RM, Plaut M, Creticos PS, Togias AG, *et al.* Role of human basophils and mast cells in the pathogenesis of allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol.* 1985;76(2 Pt 2):369–74.
150. Snyder F, Fitzgerald V, Blank ML. Biosynthesis of platelet-activating factor and enzyme inhibitors. *Adv Exp Med Biol.* 1996;416:5–10.
151. Morrow JD, Minton TA, Awad JA, Roberts LJ. Release of markedly increased quantities of prostaglandin D2 from the skin in vivo in humans following the application of sorbic acid. *Arch Dermatol.* 1994;130(11):1408–12.
152. Hirai H, Tanaka K, Yoshie O, Ogawa K, Kenmotsu K, Takamori Y, *et al.* Prostaglandin D2 selectively induces chemotaxis in T helper type 2 cells, eosinophils, and basophils via seven-transmembrane receptor CRTH2. *J Exp Med.* 2001;193(2):255–61.
153. Fujitani Y, Kanaoka Y, Aritake K, Uodome N, Okazaki-Hatake K, Urade Y. Pronounced eosinophilic lung inflammation and Th2 cytokine release in human lipocalin-type prostaglandin D synthase transgenic mice. *J Immunol.* 2002;168(1):443–9.
154. Liu MC, Bleecker ER, Lichtenstein LM, Kagey-Sobotka A, Niv Y, McLemore TL, *et al.* Evidence for elevated levels of histamine, prostaglandin D2, and other bronchoconstricting prostaglandins in the airways of subjects with mild asthma. *Am Rev Respir Dis.* 1990;142(1):126–32.
155. Samuelsson B, Dahlgren SE, Lindgren JA, Rouzer CA, Serhan CN. Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis, and biological effects. *Science.* 1987;237(4819):1171–6.
156. Singh RK, Gupta S, Dastidar S, Ray A. Cysteinyl leukotrienes and their receptors: molecular and functional characteristics. *Pharmacology.* 2010;85(6):336–49.
157. Stevens RL, Austen KF. Recent advances in the cellular and molecular biology of mast cells. *Immunol Today.* 1989;10(11):381–6.
158. Spina D, Coyle AJ, Page CP. The role of platelet activating factor in allergic inflammation. *Pulm Pharmacol.* 1989;2(1):13–9.
159. Ishii S, Shimizu T. Platelet-activating factor (PAF) receptor and genetically engineered PAF receptor mutant mice. *Prog Lipid Res.* 2000;39(1):41–82.

160. Korth R, Riess H, Brehm G, Hiller E. Unsaturated platelet-activating factor: influence on aggregation, serotonin release and thromboxane synthesis of human thrombocytes. *Thromb Res.* 1986;41(5):699–706.
161. Marshall JS. Mast-cell responses to pathogens. *Nat Rev Immunol.* 2004;4(10):787–99.
162. Williams LM, Ricchetti G, Sarma U, Smallie T, Foxwell BM. Interleukin-10 suppression of myeloid cell activation--a continuing puzzle. *Immunology.* 2004;113(3):281–92.
163. Li MO, Flavell RA. Contextual regulation of inflammation: a duet by transforming growth factor-beta and interleukin-10. *Immunity.* 2008;28(4):468–76.
164. Bradley JR. TNF-mediated inflammatory disease. *J Pathol.* 2008;214(2):149–60.
165. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood.* 2016;127(20):2391–405.
166. Valent P, Akin C, Hartmann K, Nilsson G, Reiter A, Hermine O, et al. Advances in the classification and treatment of mastocytosis: current status and outlook toward the future. *Cancer Res.* 2017;77(6):1261–70.
167. Azaña JM, Torrelo A, Mediero IG, Zambrano A. Urticaria pigmentosa: a review of 67 pediatric cases. *Pediatr Dermatol.* 1994;11(2):102–6.
168. Kettelhut BV, Metcalfe DD. Pediatric mastocytosis. *Ann Allergy.* 1994;73(3):197–202; quiz 202–7.
169. Carter MC, Metcalfe DD. Paediatric mastocytosis. *Arch Dis Child.* 2002;86(5):315–9.
170. Uzzaman A, Maric I, Noel P, Kettelhut BV, Metcalfe DD, Carter MC. Pediatric-onset mastocytosis: a long term clinical follow-up and correlation with bone marrow histopathology. *Pediatr Blood Cancer.* 2009;53(4):629–34.
171. Castells M, Metcalfe DD, Escribano L. Diagnosis and treatment of cutaneous mastocytosis in children: practical recommendations. *Am J Clin Dermatol.* 2011;12(4):259–70.
172. Torrelo A, Alvarez-Twose I, Escribano L. Childhood mastocytosis. *Curr Opin Pediatr.* 2012;24(4):480–6.
173. Hartmann K, Escribano L, Grattan C, Brockow K, Carter MC, Alvarez-Twose I, et al. Cutaneous manifestations in patients with mastocytosis: Consensus report of the European Competence Network on Mastocytosis; the American Academy of Allergy, Asthma & Immunology; and the European Academy of Allergology and Clinical Immunology. *J Allergy Clin Immunol.* 2016;137(1):35–45.

174. Méni C, Bruneau J, Georgin-Lavialle S, Le Saché de Peufeilhoux L, Damaj G, Hadj-Rabia S, *et al.* Paediatric mastocytosis: a systematic review of 1747 cases. *Br J Dermatol.* 2015;172(3):642–51.
175. Berezowska S, Flaig MJ, Ruëff F, Walz C, Haferlach T, Krokowski M, *et al.* Adult-onset mastocytosis in the skin is highly suggestive of systemic mastocytosis. *Mod Pathol.* 2014;27(1):19–29.
176. Garcia-Montero AC, Jara-Acevedo M, Teodosio C, Sanchez ML, Nunez R, Prados A, *et al.* KIT mutation in mast cells and other bone marrow haematopoietic cell lineages in systemic mast cell disorders. A prospective study of the Spanish Network on Mastocytosis (REMA) in a series of 113 patients. *Blood.* 2006;108(7):2366–72.
177. Kristensen T, Vestergaard H, Bindslev-Jensen C, Moller MB, Broesby-Olsen S. Sensitive KIT D816V mutation analysis of blood as a diagnostic test in mastocytosis. *Am J Hematol.* 2014;89(5):493–8.
178. Jara-Acevedo M, Teodosio C, Sanchez-Muñoz L, Álvarez-Twose I, Mayado A, Caldas C, *et al.* Detection of the KIT D816V mutation in peripheral blood of systemic mastocytosis: diagnostic implications. *Mod Pathol.* 2015;28(8):1138–49.
179. De Matteis G, Zanotti R, Colarossi S, De Benedittis C, Garcia-Montero A, Bonifacio M, *et al.* The impact of sensitive KIT D816V detection on recognition of indolent Systemic Mastocytosis. *Leuk Res.* 2015;39(3):273–8.
180. Bodemer C, Hermine O, Palmérini F, Yang Y, Grandpeix-Guyodo C, Leventhal PS, *et al.* Pediatric mastocytosis is a clonal disease associated with D816V and other activating c-KIT mutations. *J Invest Dermatol.* 2010;130(3):804–15.
181. Nagata H, Worobec AS, Oh CK, Chowdhury BA, Tannenbaum S, Suzuki Y, *et al.* Identification of a point mutation in the catalytic domain of the protooncogene c-kit in peripheral blood mononuclear cells of patients who have mastocytosis with an associated hematologic disorder. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(23):10560–4.
182. Furitsu T, Tsujimura T, Tono T, Ikeda H, Kitayama H, Koshimizu U, *et al.* Identification of mutations in the coding sequence of the proto-oncogene c-kit in a human mast cell leukemia cell line causing ligand-independent activation of c-kit product. *J Clin Invest.* 1993;92(4):1736–44.
183. Tsujimura T, Furitsu T, Morimoto M, Isozaki K, Nomura S, Matsuzawa Y, *et al.* Ligand-independent activation of c-kit receptor tyrosine kinase in a murine mastocytoma cell line P-815 generated by a point mutation. *Blood.* 1994;83(9):2619–26.
184. Kitayama H, Kanakura Y, Furitsu T, Tsujimura T, Oritani K, Ikeda H, *et al.* Constitutively activating mutations of c-kit receptor tyrosine kinase confer factor-independent growth and tumorigenicity of factor-dependent hematopoietic cell lines. *Blood.* 1995 Feb 1;85(3):790–8.

185. Lasho T, Finke C, Zblewski D, Hanson CA, Ketterling RP, Butterfield JH, *et al.* Concurrent activating KIT mutations in systemic mastocytosis. *Br J Haematol.* 2016;173(1):153–6.
186. Bibi S, Langenfeld F, Jeanningros S, Brenet F, Soucie E, Hermine O, *et al.* Molecular defects in mastocytosis: KIT and beyond KIT. *Immunol Allergy Clin North Am.* 2014;34(2):239–62.
187. Hartmann K, Wardelmann E, Ma Y, Merkelbach-Bruse S, Preussner LM, Woolery C, *et al.* Novel germline mutation of KIT associated with familial gastrointestinal stromal tumors and mastocytosis. *Gastroenterology.* 2005;129(3):1042–6.
188. Ryan RJ, Akin C, Castells M, Wills M, Selig MK, Nielsen GP, *et al.* Mast cell sarcoma: a rare and potentially under-recognized diagnostic entity with specific therapeutic implications. *ModPathol.* 2013;26(4):533–43.
189. Lanternier F, Cohen-Akenine A, Palmerini F, Feger F, Yang Y, Zermati Y, *et al.* Phenotypic and genotypic characteristics of mastocytosis according to the age of onset. *PloS One.* 2008;3(4):e1906.
190. Wang HJ, Lin ZM, Zhang J, Yin JH, Yang Y. A new germline mutation in KIT associated with diffuse cutaneous mastocytosis in a Chinese family. *Clin Exp Dermatol.* 2014;39(2):146–9.
191. Yang Y, L  tard S, Borge L, Chaix A, Hanssens K, Lopez S, *et al.* Pediatric mastocytosis-associated KIT extracellular domain mutations exhibit different functional and signaling properties compared with KIT-phosphotransferase domain mutations. *Blood.* 2010;116(7):1114–23.
192. Valent P, Berger J, Cerny-Reiterer S, Peter B, Eisenwort G, Hoermann G, *et al.* Chronic mast cell leukemia (MCL) with KIT S476I: a rare entity defined by leukemic expansion of mature mast cells and absence of organ damage. *Ann Hematol.* 2015;94(2):223–31.
193. Georgin-Lavialle S, Lhermitte L, Suarez F, Yang Y, Letard S, Hanssens K, *et al.* Mast cell leukemia: identification of a new c-Kit mutation, dup(501-502), and response to masitinib, a c-Kit tyrosine kinase inhibitor. *Eur J Haematol.* 2012;89(1):47–52.
194. Mital A, Piskorz A, Lewandowski K, Wasag B, Limon J, Hellmann A. A case of mast cell leukaemia with exon 9 KIT mutation and good response to imatinib. *Eur J Haematol.* 2011;86(6):531–5.
195. Ma D, Stence AA, Bossler AB, Hackman JR, Bellizzi AM. Identification of KIT activating mutations in paediatric solitary mastocytoma. *Histopathology.* 2014;64(2):218–25.
196. Zhang LY, Smith ML, Schultheis B, Fitzgibbon J, Lister TA, Melo JV, *et al.* A novel K509I mutation of KIT identified in familial mastocytosis-in vitro and in vivo responsiveness to imatinib therapy. *Leuk Res.* 2006;30(4):373–8.

197. de Melo Campos P, Machado-Neto JA, Scopim-Ribeiro R, Visconte V, Tabarroki A, Duarte ASS, *et al.* Familial systemic mastocytosis with germline KIT K509I mutation is sensitive to treatment with imatinib, dasatinib and PKC412. *Leuk Res.* 2014;38(10):1245–51.
198. Chan EC, Bai Y, Kirshenbaum AS, Fischer ER, Simakova O, Bandara G, *et al.* Mastocytosis associated with a rare germline KIT K509I mutation displays a well-differentiated mast cell phenotype. *J Allergy Clin Immunol.* 2014;134(1):178–87.
199. Akin C, Fumo G, Yavuz AS, Lipsky PE, Neckers L, Metcalfe DD. A novel form of mastocytosis associated with a transmembrane c-kit mutation and response to imatinib. *Blood.* 2004;103(8):3222–5.
200. Tang X, Boxer M, Drummond A, Ogston P, Hodgins M, Burden AD. A germline mutation in KIT in familial diffuse cutaneous mastocytosis. *J Med Genet.* 2004;41(6):e88.
201. Rocha J, Luz Duarte M, Marques H, Torres F, Tavares P, Silva A, *et al.* Association of adult mastocytosis with M541L in the transmembrane domain of KIT. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2010;24(9):1118–9.
202. Foster R, Byrnes E, Meldrum C, Griffith R, Ross G, Upjohn E, *et al.* Association of paediatric mastocytosis with a polymorphism resulting in an amino acid substitution (M541L) in the transmembrane domain of c-KIT. *Br J Dermatol.* 2008;159(5):1160–9.
203. Beghini A, Tibiletti MG, Roversi G, Chiaravalli AM, Serio G, Capella C, *et al.* Germline mutation in the juxtamembrane domain of the kit gene in a family with gastrointestinal stromal tumors and urticaria pigmentosa. *Cancer.* 2001;92(3):657–62.
204. Nakagomi N, Hirota S. Juxtamembrane-type c-kit gene mutation found in aggressive systemic mastocytosis induces imatinib-resistant constitutive KIT activation. *Lab Invest.* 2007;87(4):365–71.
205. Büttner C, Henz BM, Welker P, Sepp NT, Grabbe J. Identification of activating c-kit mutations in adult-, but not in childhood-onset indolent mastocytosis: a possible explanation for divergent clinical behavior. *J Invest Dermatol.* 1998;111(6):1227–31.
206. Fernandes IC, Teixeira M dos A, Freitas I, Selores M, Alves R, Lima M. Adult mastocytosis: a review of the Santo António Hospital's experience and an evaluation of World Health Organization criteria for the diagnosis of systemic disease. *An Bras Dermatol.* 2014;89(1):59–66.
207. Kasprowicz S, Chan I-J, Wall DJ, Tharp MD. Nodular mastocytosis. *J Am Acad Dermatol.* 2006;55(2):347–9.
208. Pollard WL, Beachkofsky TM, Kobayashi TT. Novel R634W c-kit mutation identified in familial mastocytosis. *Pediatr Dermatol.* 2015;32(2):267–70.

209. Spector MS, Iossifov I, Kritharis A, He C, Kolitz JE, Lowe SW, *et al.* Mast-cell leukemia exome sequencing reveals a mutation in the IgE mast-cell receptor β chain and KIT V654A. *Leukemia*. 2012;26(6):1422–5.
210. Kim YS, Wu H, Pawlowska AB, Bautista-Quach MA, Huang Q, Gaal K, *et al.* Pediatric mast cell sarcoma of temporal bone with novel L799F (2395 C>T) KIT mutation, mimicking histiocytic neoplasm. *Am J Surg Pathol*. 2013;37(3):453–8.
211. Sotlar K, Escribano L, Landt O, Möhrle S, Herrero S, Torrelo A, *et al.* One-step detection of c-kit point mutations using peptide nucleic acid-mediated polymerase chain reaction clamping and hybridization probes. *Am J Pathol*. 2003;162(3):737–46.
212. Yabe M, Masukawa A, Kato S, Yabe H, Nakamura N, Matsushita H. Systemic mastocytosis associated with t(8;21) acute myeloid leukemia in a child: detection of the D816A mutation of KIT. *Pediatr Blood Cancer*. 2012;59(7):1313–6.
213. Frederiksen JK, Shao L, Bixby DL, Ross CW. Shared clonal cytogenetic abnormalities in aberrant mast cells and leukemic myeloid blasts detected by single nucleotide polymorphism microarray-based whole-genome scanning. *Genes Chromosomes Cancer*. 2016;55(4):389–96.
214. Longley BJ, Metcalfe DD, Tharp M, Wang X, Tyrrell L, Lu SZ, *et al.* Activating and dominant inactivating c-KIT catalytic domain mutations in distinct clinical forms of human mastocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(4):1609–14.
215. Sotlar K, Saeger W, Stellmacher F, Stahmer J, Jäckle S, Valent P, *et al.* “Occult” mastocytosis with activating c-kit point mutation evolving into systemic mastocytosis associated with plasma cell myeloma and secondary amyloidosis. *J Clin Pathol*. 2006;59(8):875–8.
216. Pullarkat VA, Bueso-Ramos C, Lai R, Kroft S, Wilson CS, Pullarkat ST, *et al.* Systemic mastocytosis with associated clonal hematological non-mast-cell lineage disease: analysis of clinicopathologic features and activating c-kit mutations. *Am J Hematol*. 2003;73(1):12–7.
217. Valent P, Blatt K, Eisenwort G, Herrmann H, Cerny-Reiterer S, Thalhammer R, *et al.* FLAG-induced remission in a patient with acute mast cell leukemia (MCL) exhibiting t(7;10)(q22;q26) and KIT D816H. *Leuk Res Rep*. 2014;3(1):8–13.
218. Yanagihori H, Oyama N, Nakamura K, Kaneko F. c-kit Mutations in patients with childhood-onset mastocytosis and genotype-phenotype correlation. *J Mol Diagn*. 2005;7(2):252–7.
219. Heinrich MC, Joensuu H, Demetri GD, Corless CL, Apperley J, Fletcher JA, *et al.* Phase II, open-label study evaluating the activity of imatinib in treating life-threatening malignancies known to be associated with imatinib-sensitive tyrosine kinases. *Clin Cancer Res*. 2008;14(9):2717–25.

220. Pignon JM, Giraudier S, Duquesnoy P, Jouault H, Imbert M, Vainchenker W, *et al.* A new c-kit mutation in a case of aggressive mast cell disease. *Br J Haematol.* 1997;96(2):374–6.
221. Wasag B, Niedoszytko M, Piskorz A, Lange M, Renke J, Jassem E, *et al.* Novel, activating KIT-N822I mutation in familial cutaneous mastocytosis. *Exp Hematol.* 2011;39(8):859–65.e2.
222. Arredondo AR, Gotlib J, Shier L, Medeiros B, Wong K, Cherry A, *et al.* Myelomastocytic leukemia versus mast cell leukemia versus systemic mastocytosis associated with acute myeloid leukemia: a diagnostic challenge. *Am J Hematol.* 2010;85(8):600–6.
223. Bugalia A, Abraham A, Balasubramanian P, Srivastava A, Nair S. Mast cell sarcoma of the small intestine: a case report. *J Clin Pathol.* 2011;64(11):1035–7.
224. Baek JO, Kang HK, Na SY, Lee JR, Roh JY, Lee JH, *et al.* N822K c-kit mutation in CD30-positive cutaneous pleomorphic mastocytosis after germ cell tumour of the ovary. *Br J Dermatol.* 2012;166(6):1370–3.
225. Wöhrl S, Moritz KB, Bracher A, Fischer G, Stingl G, Loewe R. A c-kit mutation in exon 18 in familial mastocytosis. *J Invest Dermatol.* 2013;133(3):839–41.
226. Hoffmann KM, Moser A, Lohse P, Winkler A, Binder B, Sovinz P, *et al.* Successful treatment of progressive cutaneous mastocytosis with imatinib in a 2-year-old boy carrying a somatic KIT mutation. *Blood.* 2008;112(5):1655–7.
227. Valent P. Mastocytosis: a paradigmatic example of a rare disease with complex biology and pathology. *Am J Cancer Res.* 2013;3(2):159–72.
228. Brockow K. Epidemiology, prognosis, and risk factors in mastocytosis. *Immunol Allergy Clin North Am.* 2014;34(2):283–95.
229. Bonadonna P, Perbellini O, Passalacqua G, Caruso B, Colarossi S, Dal Fior D, *et al.* Clonal mast cell disorders in patients with systemic reactions to Hymenoptera stings and increased serum tryptase levels. *J Allergy Clin Immunol.* 2009;123(3):680–6.
230. Zanotti R, Bonadonna P, Bonifacio M, Artuso A, Schena D, Rossini M, *et al.* Isolated bone marrow mastocytosis: an underestimated subvariant of indolent systemic mastocytosis. *Haematologica.* 2011;96(3):482–4.
231. Gülen T, Häggglund H, Sander B, Dahlén B, Nilsson G. The presence of mast cell clonality in patients with unexplained anaphylaxis. *Clin Exp Allergy.* 2014;44(9):1179–87.
232. Alvarez-Twose I, Matito A, Sánchez-Muñoz L, Morgado JM, Orfao A, Escribano L, *et al.* Contribution of highly sensitive diagnostic methods to the diagnosis of systemic mastocytosis in the absence of skin lesions. *Allergy.* 2012;67(9):1190–1.
233. Carter MC, Metcalfe DD, Komarow HD. Mastocytosis. *Immunol Allergy Clin North Am.* 2014;34(1):181–96.

234. Grimm V, Mempel M, Ring J, Abeck D. Congenital symptomatic dermographism as the first symptom of mastocytosis. *Br J Dermatol*. 2000;143(5):1109.
235. Greenhawt M, Akin C. Mastocytosis and allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2007;7(5):387–92.
236. Metcalfe DD. Differential diagnosis of the patient with unexplained flushing/anaphylaxis. *Allergy Asthma Proc*. 2000;21(1):21–4.
237. Izikson L, English JC, Zirwas MJ. The flushing patient: differential diagnosis, workup, and treatment. *J Am Acad Dermatol*. 2006;55(2):193–208.
238. Brockow K, Ring J, Alvarez-Twose I, Orfao A, Escribano L. Extensive blistering is a predictor for severe complications in children with mastocytosis. *Allergy*. 2012;67(10):1323–4.
239. Jensen RT. Gastrointestinal abnormalities and involvement in systemic mastocytosis. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2000;14(3):579–623.
240. Doyle LA, Sepehr GJ, Hamilton MJ, Akin C, Castells MC, Hornick JL. A clinicopathologic study of 24 cases of systemic mastocytosis involving the gastrointestinal tract and assessment of mucosal mast cell density in irritable bowel syndrome and asymptomatic patients. *Am J Surg Pathol*. 2014;38(6):832–43.
241. Metcalfe DD. The liver, spleen, and lymph nodes in mastocytosis. *J Invest Dermatol*. 1991;96(3 Suppl):45S–46S.
242. Mican JM, Di Bisceglie AM, Fong TL, Travis WD, Kleiner DE, Baker B, *et al*. Hepatic involvement in mastocytosis: clinicopathologic correlations in 41 cases. *Hepatology*. 1995;22(4 Pt 1):1163–70.
243. González de Olano D, de la Hoz Caballer B, Núñez López R, Sánchez Muñoz L, Cuevas Agustín M, Diéguez MC, *et al*. Prevalence of allergy and anaphylactic symptoms in 210 adult and pediatric patients with mastocytosis in Spain: a study of the Spanish network on mastocytosis (REMA). *Clin Exp Allergy*. 2007;37(10):1547–55.
244. Brockow K, Jofer C, Behrendt H, Ring J. Anaphylaxis in patients with mastocytosis: a study on history, clinical features and risk factors in 120 patients. *Allergy*. 2008;63(2):226–32.
245. Alvarez-Twose I, Vañó-Galván S, Sánchez-Muñoz L, Morgado JM, Matito A, Torrelo A, *et al*. Increased serum baseline tryptase levels and extensive skin involvement are predictors for the severity of mast cell activation episodes in children with mastocytosis. *Allergy*. 2012;67(6):813–21.
246. van Anrooij B, van der Veer E, de Monchy JGR, van der Heide S, Kluin-Nelemans JC, van Voorst Vader PC, *et al*. Higher mast cell load decreases the risk of Hymenoptera venom-induced anaphylaxis in patients with mastocytosis. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;132(1):125–30.

247. Barete S, Assous N, de Gennes C, Grandpeix C, Feger F, Palmerini F, *et al.* Systemic mastocytosis and bone involvement in a cohort of 75 patients. *Ann Rheum Dis.* 2010;69(10):1838–41.
248. van der Veer E, van der Goot W, de Monchy JGR, Kluin-Nelemans HC, van Doormaal JJ. High prevalence of fractures and osteoporosis in patients with indolent systemic mastocytosis. *Allergy.* 2012;67(3):431–8.
249. Rossini M, Zanotti R, Viapiana O, Tripi G, Orsolini G, Idolazzi L, *et al.* Bone involvement and osteoporosis in mastocytosis. *Immunol Allergy Clin North Am.* 2014;34(2):383–96.
250. McKenna MJ, Frame B. The mast cell and bone. *Clin Orthop.* 1985;(200):226–33.
251. Biosse-Duplan M, Baroukh B, Dy M, de Vernejoul M-C, Saffar J-L. Histamine promotes osteoclastogenesis through the differential expression of histamine receptors on osteoclasts and osteoblasts. *Am J Pathol.* 2009;174(4):1426–34.
252. Genovese A, Spadaro G, Triggiani M, Marone G. Clinical advances in mastocytosis. *Int J Clin Lab Res.* 1995;25(4):178–88.
253. Kanzaki S, Takahashi T, Kanno T, Ariyoshi W, Shinmyozu K, Tujisawa T, *et al.* Heparin inhibits BMP-2 osteogenic bioactivity by binding to both BMP-2 and BMP receptor. *J Cell Physiol.* 2008;216(3):844–50.
254. Theoharides TC, Boucher W, Spear K. Serum interleukin-6 reflects disease severity and osteoporosis in mastocytosis patients. *Int Arch Allergy Immunol.* 2002;128(4):344–50.
255. Kushnir-Sukhov NM, Brittain E, Reynolds JC, Akin C, Metcalfe DD. Elevated tryptase levels are associated with greater bone density in a cohort of patients with mastocytosis. *Int Arch Allergy Immunol.* 2006;139(3):265–70.
256. Fritz J, Fishman EK, Carrino JA, Horger MS. Advanced imaging of skeletal manifestations of systemic mastocytosis. *Skeletal Radiol.* 2012;41(8):887–97.
257. Hermine O, Lortholary O, Leventhal PS, Catteau A, Soppelsa F, Baude C, *et al.* Case-control cohort study of patients' perceptions of disability in mastocytosis. *PLoS One.* 2008;3(5):e2266.
258. Jennings S, Russell N, Jennings B, Slee V, Sterling L, Castells M, *et al.* The Mastocytosis Society survey on mast cell disorders: patient experiences and perceptions. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2014;2(1):70–6.
259. Horny HP, Metcalfe DD, Bennet JM, Bain BJ, Akin C, Escribano L, *et al.* Mastocytosis. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, *et al.*, editors. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: IARC;2008:54–63.
260. Skrabbs CC. Darier sign: a historical note. *Arch Dermatol.* 2002;138(9):1253–4.

261. D'Arena G, Vita G, Musto P. Darier sign and cutaneous involvement in mastocytosis. *Br J Haematol*. 2014;167(4):440.
262. Galen BT, Rose MG. Darier's sign in mastocytosis. *Blood*. 2014 20;123(8):1127.
263. Bussmann C, Hagemann T, Hanfland J, Haidl G, Bieber T, Novak N. Flushing and increase of serum tryptase after mechanical irritation of a solitary mastocytoma. *Eur J Dermatol*. 2007;17(4):332–4.
264. Simone JV, Hayes WT. Bullous urticaria pigmentosa with bleeding. *J Pediatr*. 1971;78(1):160–6.
265. Wawrzycki B, Pietrzak A, Chodorowska G, Kanitakis J. Diffuse cutaneous bullous mastocytosis in a newborn. *Dermatol Ther*. 2013;26(2):176–9.
266. Murphy M, Walsh D, Drumm B, Watson R. Bullous mastocytosis: a fatal outcome. *Pediatr Dermatol*. 1999;16(6):452–5.
267. Carter MC, Clayton ST, Komarow HD, Brittain EH, Scott LM, Cantave D, *et al*. Assessment of clinical findings, tryptase levels, and bone marrow histopathology in the management of pediatric mastocytosis. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;136(6):1673–9.e3.
268. Sangster A. An anomalous mottled rash, accompanied by pruritus, factitious urticaria and pigmentation, “urticaria pigmentosa”? *Trans Med Soc Lond*. 1878;11:161–3.
269. Wolff K, Komar M, Petzelbauer P. Clinical and histopathological aspects of cutaneous mastocytosis. *Leuk Res*. 2001;25(7):519–28.
270. Weber A, Knop J, Maurer M. Pattern analysis of human cutaneous mast cell populations by total body surface mapping. *Br J Dermatol*. 2003;148(2):224–8.
271. Hartmann K, Henz BM. Classification of cutaneous mastocytosis: a modified consensus proposal. *Leuk Res*. 2002;26(5):483–4; author reply 485–6.
272. Pérez-Pérez L, Allegue F, Caeiro JL, Fabeiro JM, Pérez Rodríguez A, Zulaica A. Coexistence of two types of clinical lesions in childhood-onset mastocytosis. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*. 2011;77(2):184–7.
273. Vano-Galvan S, Alvarez-Twose I, De las Heras E, Heras EDL, Morgado JM, Matito A, *et al*. Dermoscopic features of skin lesions in patients with mastocytosis. *Arch Dermatol*. 2011;147(8):932–40.
274. Griffiths WA, Daneshbod K. Pseudoxanthomatous mastocytosis. *Br J Dermatol*. 1975;93(1):91–5.
275. Srivastava N, Chand S, Singh S. Pseudoxanthomatous mastocytosis. *Int J Dermatol*. 2008;47(1):50–1.

276. Revert A, Jordá E, Ramón D, Verdeguer JM, Torres V, Pitarch A. Xanthelasmoid mastocytosis. *Pediatr Dermatol*. 1991;8(2):152–4.
277. Husak R, Blume-Peytavi U, Pfrommer C, Geilen CC, Goerdts S, Orfanos CE. Nodular and bullous cutaneous mastocytosis of the xanthelasmoid type: case report. *Br J Dermatol*. 2001;144(2):355–8.
278. Sarkany RP, Monk BE, Handfield-Jones SE. Telangiectasia macularis eruptiva perstans: a case report and review of the literature. *Clin Exp Dermatol*. 1998;23(1):38–9.
279. Parks A, Camisa C. Reddish-brown macules with telangiectasia and pruritus. Urticaria pigmentosa-telangiectasia macularis eruptiva perstans (TMEP) variant, with systemic mastocytosis. *Arch Dermatol*. 1988;124(3):429–30,432–3.
280. Lee H-W, Jeong Y-I, Choi J-C, Lee M-W, Choi J-H, Moon K-C, *et al*. Two cases of telangiectasia macularis eruptiva perstans demonstrated by immunohistochemistry for c-kit (CD 117). *J Dermatol*. 2005;32(10):817–20.
281. Lange M, Niedozytko M, Niedozytko B, Łata J, Trzeciak M, Biernat W. Diffuse cutaneous mastocytosis: analysis of 10 cases and a brief review of the literature. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2012;26(12):1565–71.
282. Pandhi D, Singal A, Aggarwal S. Adult onset, hypopigmented solitary mastocytoma: report of two cases. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*. 2008;74(1):41–3.
283. Cohen PR. Solitary mastocytoma presenting in an adult: report and literature review of adult-onset solitary cutaneous mastocytoma with recommendations for evaluation and treatment. *Dermatol Pract Concept*. 2016;6(3):31–8.
284. Thappa DM, Jeevankumar B. Solitary mastocytoma. *Indian Pediatr*. 2005;42(4):390.
285. Valent P, Akin C, Escribano L, Födinger M, Hartmann K, Brockow K, *et al*. Standards and standardization in mastocytosis: consensus statements on diagnostics, treatment recommendations and response criteria. *Eur J Clin Invest*. 2007;37(6):435–53.
286. Akin C, Valent P. Diagnostic criteria and classification of mastocytosis in 2014. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2014;34(2):207–18.
287. Lim K-H, Tefferi A, Lasho TL, Finke C, Patnaik M, Butterfield JH, *et al*. Systemic mastocytosis in 342 consecutive adults: survival studies and prognostic factors. *Blood*. 2009;113(23):5727–36.
288. Pardanani A. Systemic mastocytosis in adults: 2015 update on diagnosis, risk stratification, and management. *Am J Hematol*. 2015;90(3):250–62.
289. Sperr WR, Horny H-P, Valent P. Spectrum of associated clonal hematologic non-mast cell lineage disorders occurring in patients with systemic mastocytosis. *Int Arch Allergy Immunol*. 2002;127(2):140–2.

290. Horny H-P, Sotlar K, Sperr WR, Valent P. Systemic mastocytosis with associated clonal haematological non-mast cell lineage diseases: a histopathological challenge. *J Clin Pathol*. 2004;57(6):604–8.
291. Horny H-P, Sotlar K, Valent P. Mastocytosis: state of the art. *Pathobiology*. 2007;74(2):121–32.
292. Valent P, Sperr WR, Akin C. How I treat patients with advanced systemic mastocytosis. *Blood*. 2010;116(26):5812–7.
293. Verstovsek S. Advanced systemic mastocytosis: the impact of KIT mutations in diagnosis, treatment, and progression. *Eur J Haematol*. 2013;90(2):89–98.
294. Valent P, Horny HP, Escribano L, Longley BJ, Li CY, Schwartz LB, *et al*. Diagnostic criteria and classification of mastocytosis: a consensus proposal. *Leuk Res*. 2001;25(7):603–25.
295. Horny HP, Valent P. Diagnosis of mastocytosis: general histopathological aspects, morphological criteria, and immunohistochemical findings. *Leuk Res*. 2001;25(7):543–51.
296. Sánchez-Muñoz L, Alvarez-Twose I, García-Montero AC, Teodosio C, Jara-Acevedo M, Pedreira CE, *et al*. Evaluation of the WHO criteria for the classification of patients with mastocytosis. *Mod Pathol*. 2011;24(9):1157–68.
297. Akin C, Scott LM, Metcalfe DD. Slowly progressive systemic mastocytosis with high mast-cell burden and no evidence of a non-mast-cell hematologic disorder: an example of a smoldering case? *Leuk Res*. 2001;25(7):635–8.
298. Hauswirth AW, Sperr WR, Ghannadan M, Schernthaner GH, Jordan JH, Fritsche-Polanz R, *et al*. A case of smouldering mastocytosis with peripheral blood eosinophilia and lymphadenopathy. *Leuk Res*. 2002;26(6):601–6.
299. Valent P, Akin C, Sperr WR, Horny H-P, Metcalfe DD. Smouldering mastocytosis: a novel subtype of systemic mastocytosis with slow progression. *Int Arch Allergy Immunol*. 2002;127(2):137–9.
300. Krokowski M, Sotlar K, Krauth M-T, Födinger M, Valent P, Horny H-P. Delineation of patterns of bone marrow mast cell infiltration in systemic mastocytosis: value of CD25, correlation with subvariants of the disease, and separation from mast cell hyperplasia. *Am J Clin Pathol*. 2005;124(4):560–8.
301. Horny H-P, Sotlar K, Valent P. Differential diagnoses of systemic mastocytosis in routinely processed bone marrow biopsy specimens: a review. *Pathobiology*. 2010;77(4):169–80.
302. Chiu A, Nanaji NM, Czader M, Gheorghe G, Knowles DM, Chadburn A, *et al*. The stromal composition of mast cell aggregates in systemic mastocytosis. *Mod Pathol*. 2009;22(7):857–65.

303. Álvarez-Twose I, Morgado JM, Sánchez-Muñoz L, García-Montero A, Mollejo M, Orfao A, *et al.* Current state of biology and diagnosis of clonal mast cell diseases in adults. *Int J Lab Hematol.* 2012;34(5):445–60.
304. Teodosio C, García-Montero AC, Jara-Acevedo M, Sánchez-Muñoz L, Álvarez-Twose I, Núñez R, *et al.* Mast cells from different molecular and prognostic subtypes of systemic mastocytosis display distinct immunophenotypes. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125(3):719–26.
305. Sperr WR, Horny HP, Lechner K, Valent P. Clinical and biologic diversity of leukemias occurring in patients with mastocytosis. *Leuk Lymphoma.* 2000;37(5-6):473–86.
306. Bae MH, Kim H-K, Park C-J, Seo E-J, Park SH, Cho Y-U, *et al.* A case of systemic mastocytosis associated with acute myeloid leukemia terminating as aleukemic mast cell leukemia after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Ann Lab Med.* 2013;33(2):125–9.
307. Wang SA, Hutchinson L, Tang G, Chen SS, Miron PM, Huh YO, *et al.* Systemic mastocytosis with associated clonal hematological non-mast cell lineage disease: clinical significance and comparison of chromosomal abnormalities in SM and AHNMD components. *Am J Hematol.* 2013;88(3):219–24.
308. Bernd H-W, Sotlar K, Lorenzen J, Osieka R, Fabry U, Valent P, *et al.* Acute myeloid leukaemia with t(8;21) associated with “occult” mastocytosis. Report of an unusual case and review of the literature. *J Clin Pathol.* 2004;57(3):324–8.
309. Sotlar K, Colak S, Bache A, Berezowska S, Krokowski M, Bültmann B, *et al.* Variable presence of KITD816V in clonal haematological non-mast cell lineage diseases associated with systemic mastocytosis (SM-AHNMD). *J Pathol.* 2010;220(5):586–95.
310. Traina F, Visconte V, Jankowska AM, Makishima H, O’Keefe CL, Elson P, *et al.* Single nucleotide polymorphism array lesions, TET2, DNMT3A, ASXL1 and CBL mutations are present in systemic mastocytosis. *PloS One.* 2012;7(8):e43090.
311. Schwaab J, Schnittger S, Sotlar K, Walz C, Fabarius A, Pffrman M, *et al.* Comprehensive mutational profiling in advanced systemic mastocytosis. *Blood.* 2013 3;122(14):2460–6.
312. Damaj G, Joris M, Chandesris O, Hanssens K, Soucie E, Canioni D, *et al.* ASXL1 but not TET2 mutations adversely impact overall survival of patients suffering systemic mastocytosis with associated clonal hematologic non-mast-cell diseases. *PloS One.* 2014;9(1):e85362.
313. Hanssens K, Brenet F, Agopian J, Georgin-Lavialle S, Damaj G, Cabaret L, *et al.* SRSF2-p95 hotspot mutation is highly associated with advanced forms of mastocytosis and mutations in epigenetic regulator genes. *Haematologica.* 2014;99(5):830–5.

314. Tefferi A, Levine RL, Lim K-H, Abdel-Wahab O, Lasho TL, Patel J, *et al.* Frequent TET2 mutations in systemic mastocytosis: clinical, KITD816V and FIP1L1-PDGFRA correlates. *Leukemia*. 2009;23(5):900–4.
315. Wilson TM, Maric I, Simakova O, Bai Y, Chan EC, Olivares N, *et al.* Clonal analysis of NRAS activating mutations in KIT-D816V systemic mastocytosis. *Haematologica*. 2011;96(3):459–63.
316. Noack F, Sotlar K, Notter M, Thiel E, Valent P, Horny H-P. Aleukemic mast cell leukemia with abnormal immunophenotype and c-kit mutation D816V. *Leuk Lymphoma*. 2004;45(11):2295–302.
317. Penack O, Sotlar K, Noack F, Horny H-P, Thiel E, Notter M. Cladribine therapy in a patient with an aleukemic subvariant of mast cell leukemia. *Ann Hematol*. 2005;84(10):692–3.
318. Zeerleder S, van Oers M. Aleukemic variant of mast cell leukemia. *Blood*. 2012;119(9):1961.
319. Georgin-Lavialle S, Aguilar C, Guieze R, Lhermitte L, Bruneau J, Fraitag S, *et al.* Mast cell sarcoma: a rare and aggressive entity--report of two cases and review of the literature. *J Clin Oncol*. 2013;31(6):e90–7.
320. Escribano L, Orfao A, Villarrubia J, Martín F, Madruga JI, Cuevas M, *et al.* Sequential immunophenotypic analysis of mast cells in a case of systemic mast cell disease evolving to a mast cell leukemia. *Cytometry*. 1997;30(2):98–102.
321. Gülen T, Sander B, Nilsson G, Palmblad J, Sotlar K, Horny H-P, *et al.* Systemic mastocytosis: progressive evolution of an occult disease into fatal mast cell leukemia: unique findings on an unusual hematological neoplasm. *Med Oncol*. 2012;29(5):3540–6.
322. Krauth MT, Födinger M, Rebuzzi L, Greul R, Chott A, Valent P. Aggressive systemic mastocytosis with sarcoma-like growth in the skeleton, leukemic progression, and partial loss of mast cell differentiation antigens. *Haematologica*. 2007;92(12):e126–9.
323. Georgin-Lavialle S, Lhermitte L, Dubreuil P, Chandesris M-O, Hermine O, Damaj G. Mast cell leukemia. *Blood*. 2013;121(8):1285–95.
324. Valent P, Sotlar K, Sperr WR, Escribano L, Yavuz S, Reiter A, *et al.* Refined diagnostic criteria and classification of mast cell leukemia (MCL) and myelomastocytic leukemia (MML): a consensus proposal. *Ann Oncol*. 2014;25(9):1691–700.
325. Weiler CR, Butterfield J. Mast cell sarcoma: clinical management. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2014;34(2):423–32.
326. Brcić L, Vuletić LB, Stepan J, Bonevski A, Jakovljević G, Gasparov S, *et al.* Mast-cell sarcoma of the tibia. *J Clin Pathol*. 2007;60(4):424–5.

327. Falletti J, Borgia L, Lalinga AV, De Cecio R, Natella V, Patitucci G, *et al.* Mast cell sarcoma of the scalp: the first sign of undisclosed systemic mastocytosis? *Pathol Res Pract.* 2012;208(11):683–6.
328. Kojima M, Nakamura S, Itoh H, Ohno Y, Masawa N, Joshita T, *et al.* Mast cell sarcoma with tissue eosinophilia arising in the ascending colon. *Mod Pathol.* 1999;12(7):739–43.
329. Horny HP, Parwaresch MR, Kaiserling E, Müller K, Olbermann M, Mainzer K, *et al.* Mast cell sarcoma of the larynx. *J Clin Pathol.* 1986 Jun;39(6):596–602.
330. Guenther PP, Huebner A, Sobottka SB, Neumeister V, Weissbach G, Todt H, *et al.* Temporary response of localized intracranial mast cell sarcoma to combination chemotherapy. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2001;23(2):134–8.
331. Bautista-Quach MA, Booth CL, Kheradpour A, Zuppan CW, Rowsell EH, Weiss L, *et al.* Mast cell sarcoma in an infant: a case report and review of the literature. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2013;35(4):315–20.
332. Auquit-Auckbur I, Lazar C, Deneuve S, Guillemet C, Cordel N, Blanchard F, *et al.* Malignant transformation of mastocytoma developed on skin mastocytosis into cutaneous mast cell sarcoma. *Am J Surg Pathol.* 2012;36(5):779–82.
333. Ma HB, Xu X, Liu WP, Chang H, Zeng F, Wang YC. Successful treatment of mast cell sarcoma of the uterus with imatinib. *Int J Hematol.* 2011;94(5):491–4.
334. Valent P, Sperr WR, Samorapoompichit P, Geissler K, Lechner K, Horny HP, *et al.* Myelomastocytic overlap syndromes: biology, criteria, and relationship to mastocytosis. *Leuk Res.* 2001;25(7):595–602.
335. Valent P, Samorapoompichit P, Sperr WR, Horny H-P, Lechner K. Myelomastocytic leukemia: myeloid neoplasm characterized by partial differentiation of mast cell-lineage cells. *Hematol J.* 2002;3(2):90–4.
336. Sperr WR, Drach J, Hauswirth AW, Ackermann J, Mitterbauer M, Mitterbauer G, *et al.* Myelomastocytic leukemia: evidence for the origin of mast cells from the leukemic clone and eradication by allogeneic stem cell transplantation. *Clin Cancer Res.* 2005;11(19 Pt 1):6787–92.
337. Escribano L, Alvarez-Twose I, Garcia-Montero A, Sanchez-Muñoz L, Jara-Acevedo M, Orfao A. Indolent systemic mastocytosis without skin involvement vs. isolated bone marrow mastocytosis. *Haematologica.* 2011;96(4):e26.
338. Hollmann TJ, Brenn T, Hornick JL. CD25 expression on cutaneous mast cells from adult patients presenting with urticaria pigmentosa is predictive of systemic mastocytosis. *Am J Surg Pathol.* 2008;32(1):139–45.
339. Sperr WR, Escribano L, Jordan JH, Schernthaner GH, Kundi M, Horny HP, *et al.* Morphologic properties of neoplastic mast cells: delineation of stages of maturation and implication for cytological grading of mastocytosis. *Leuk Res.* 2001;25(7):529–36.

340. Horny H-P, Sotlar K, Stellmacher F, Krokowski M, Agis H, Schwartz LB, *et al.* The tryptase positive compact round cell infiltrate of the bone marrow (TROCI-BM): a novel histopathological finding requiring the application of lineage specific markers. *J Clin Pathol.* 2006;59(3):298–302.
341. Escribano L, Diaz-Agustin B, López A, Núñez López R, García-Montero A, Almeida J, *et al.* Immunophenotypic analysis of mast cells in mastocytosis: When and how to do it. Proposals of the Spanish Network on Mastocytosis (REMA). *Cytometry B Clin Cytom.* 2004;58(1):1–8.
342. Sánchez-Muñoz L, Teodósio C, Morgado JM, Escribano L. Immunophenotypic characterization of bone marrow mast cells in mastocytosis and other mast cell disorders. *Methods Cell Biol.* 2011;103:333–59.
343. Morgado JM, Sánchez-Muñoz L, Teodósio CG, Jara-Acevedo M, Alvarez-Twose I, Matito A, *et al.* Immunophenotyping in systemic mastocytosis diagnosis: “CD25 positive” alone is more informative than the “CD25 and/or CD2” WHO criterion. *Mod Pathol.* 2012;25(4):516–21.
344. Morgado JM, Perbellini O, Johnson RC, Teodósio C, Matito A, Álvarez-Twose I, *et al.* CD30 expression by bone marrow mast cells from different diagnostic variants of systemic mastocytosis. *Histopathology.* 2013;63(6):780–7.
345. Sotlar K, Horny H-P, Simonitsch I, Krokowski M, Aichberger KJ, Mayerhofer M, *et al.* CD25 indicates the neoplastic phenotype of mast cells: a novel immunohistochemical marker for the diagnosis of systemic mastocytosis (SM) in routinely processed bone marrow biopsy specimens. *Am J Surg Pathol.* 2004;28(10):1319–25.
346. Sotlar K, Cerny-Reiterer S, Petat-Dutter K, Hessel H, Berezowska S, Müllauer L, *et al.* Aberrant expression of CD30 in neoplastic mast cells in high-grade mastocytosis. *Mod Pathol.* 2011;24(4):585–95.
347. Baumgartner C, Sonneck K, Krauth M-T, Kneidinger M, Födinger M, Hauswirth AW, *et al.* Immunohistochemical assessment of CD25 is equally sensitive and diagnostic in mastocytosis compared to flow cytometry. *Eur J Clin Invest.* 2008;38(5):326–35.
348. Beghini A, Cairolì R, Morra E, Larizza L. In vivo differentiation of mast cells from acute myeloid leukemia blasts carrying a novel activating ligand-independent C-kit mutation. *Blood Cells Mol Dis.* 1998;24(2):262–70.
349. Sakuma Y, Sakurai S, Oguni S, Hironaka M, Saito K. Alterations of the c-kit gene in testicular germ cell tumors. *Cancer Sci.* 2003;94(6):486–91.
350. Sakuma Y, Sakurai S, Oguni S, Satoh M, Hironaka M, Saito K. c-kit gene mutations in intracranial germinomas. *Cancer Sci.* 2004;95(9):716–20.
351. Hirota S, Isozaki K, Moriyama Y, Hashimoto K, Nishida T, Ishiguro S, *et al.* Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. *Science.* 1998 23;279(5350):577–80.

352. Dugas-Breit S, Schöpf P, Dugas M, Schiff H, Ruëff F, Przybilla B. Baseline serum levels of mast cell tryptase are raised in hemodialysis patients and associated with severity of pruritus. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2005;3(5):343–7.
353. Ferrer M, Nuñez-Córdoba JM, Luquin E, Grattan CE, De la Borbolla JM, Sanz ML, *et al.* Serum total tryptase levels are increased in patients with active chronic urticaria. *Clin Exp Allergy.* 2010;40(12):1760–6.
354. Sperr WR, El-Samahi A, Kundi M, Girschikofsky M, Winkler S, Lutz D, *et al.* Elevated tryptase levels selectively cluster in myeloid neoplasms: a novel diagnostic approach and screen marker in clinical haematology. *Eur J Clin Invest.* 2009;39(10):914–23.
355. Longley BJ, Tyrrell L, Lu SZ, Ma YS, Langley K, Ding TG, *et al.* Somatic c-KIT activating mutation in urticaria pigmentosa and aggressive mastocytosis: establishment of clonality in a human mast cell neoplasm. *Nat Genet.* 1996;12(3):312–4.
356. Kristensen T, Vestergaard H, Moller MB. Improved detection of the KIT D816V mutation in patients with systemic mastocytosis using a quantitative and highly sensitive real-time qPCR assay. *J Mol Diagn.* 2011;13(2):180–8.
357. Gleixner KV, Mayerhofer M, Cerny-Reiterer S, Hörmann G, Rix U, Bennett KL, *et al.* KIT-D816V-independent oncogenic signaling in neoplastic cells in systemic mastocytosis: role of Lyn and Btk activation and disruption by dasatinib and bosutinib. *Blood.* 2011;118(7):1885–98.
358. Jawhar M, Schwaab J, Schnittger S, Meggendorfer M, Pffirmann M, Sotlar K, *et al.* Additional mutations in SRSF2, ASXL1 and/or RUNX1 identify a high-risk group of patients with KIT D816V(+) advanced systemic mastocytosis. *Leukemia.* 2016;30(1):136–43.
359. Laine E, Chauvot de Beauchêne I, Perahia D, Auclair C, Tchertanov L. Mutation D816V alters the internal structure and dynamics of c-KIT receptor cytoplasmic region: implications for dimerization and activation mechanisms. *PLoS Comput Biol.* 2011;7(6):e1002068.
360. Ma Y, Zeng S, Metcalfe DD, Akin C, Dimitrijevic S, Butterfield JH, *et al.* The c-KIT mutation causing human mastocytosis is resistant to STI571 and other KIT kinase inhibitors; kinases with enzymatic site mutations show different inhibitor sensitivity profiles than wild-type kinases and those with regulatory-type mutations. *Blood.* 2002;99(5):1741–4.
361. Frost MJ, Ferrao PT, Hughes TP, Ashman LK. Juxtamembrane mutant V560GKit is more sensitive to Imatinib (STI571) compared with wild-type c-kit whereas the kinase domain mutant D816VKit is resistant. *Mol Cancer Ther.* 2002;1(12):1115–24.
362. Akin C, Brockow K, D'Ambrosio C, Kirshenbaum AS, Ma Y, Longley BJ, *et al.* Effects of tyrosine kinase inhibitor STI571 on human mast cells bearing wild-type or mutated c-kit. *Exp Hematol.* 2003;31(8):686–92.

363. Akin C, Kirshenbaum AS, Semere T, Worobec AS, Scott LM, Metcalfe DD. Analysis of the surface expression of c-kit and occurrence of the c-kit Asp816Val activating mutation in T cells, B cells, and myelomonocytic cells in patients with mastocytosis. *Exp Hematol*. 2000;28(2):140–7.
364. Yavuz AS, Lipsky PE, Yavuz S, Metcalfe DD, Akin C. Evidence for the involvement of a hematopoietic progenitor cell in systemic mastocytosis from single-cell analysis of mutations in the c-kit gene. *Blood*. 2002;100(2):661–5.
365. Teodosio C, García-Montero AC, Jara-Acevedo M, Alvarez-Twose I, Sánchez-Muñoz L, Almeida J, *et al*. An immature immunophenotype of bone marrow mast cells predicts for multilineage D816V KIT mutation in systemic mastocytosis. *Leukemia*. 2012;26(5):951–8.
366. Soucie E, Hanssens K, Mercher T, Georgin-Lavialle S, Damaj G, Livideanu C, *et al*. In aggressive forms of mastocytosis, TET2 loss cooperates with c-KITD816V to transform mast cells. *Blood*. 2012;120(24):4846–9.
367. Pardanani A, Lasho T, Elala Y, Wassie E, Finke C, Reichard KK, *et al*. Next-generation sequencing in systemic mastocytosis: Derivation of a mutation-augmented clinical prognostic model for survival. *Am J Hematol*. 2016;91(9):888–93.
368. Broesby-Olsen S, Kristensen T, Vestergaard H, Brixen K, Moller MB, Bindselev-Jensen C. KIT D816V mutation burden does not correlate to clinical manifestations of indolent systemic mastocytosis. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;132(3):723–8.
369. Gotlib J, Pardanani A, Akin C, Reiter A, George T, Hermine O, *et al*. International Working Group-Myeloproliferative Neoplasms Research and Treatment (IWG-MRT) & European Competence Network on Mastocytosis (ECNM) consensus response criteria in advanced systemic mastocytosis. *Blood*. 2013;121(13):2393–401.
370. Pardanani A, Lim K-H, Lasho TL, Finke CM, McClure RF, Li C-Y, *et al*. WHO subvariants of indolent mastocytosis: clinical details and prognostic evaluation in 159 consecutive adults. *Blood*. 2010;115(1):150–1.
371. Pardanani A. How I treat patients with indolent and smoldering mastocytosis (rare conditions but difficult to manage). *Blood*. 2013;121(16):3085–94.
372. Matito A, Morgado JM, Álvarez-Twose I, Sánchez-Muñoz L, Pedreira CE, Jara-Acevedo M, *et al*. Serum tryptase monitoring in indolent systemic mastocytosis: association with disease features and patient outcome. *PloS One*. 2013;8(10):e76116.
373. Alvarez-Twose I, Matito A, Sánchez-Muñoz L, Morgado JM, Escribano L. Management of adult mastocytosis. *Expert Opin Orphan Drugs*. 2014;2(4):321–36.

374. Broesby-Olsen S, Dybedal I, Gülen T, Kielsgaard Kristensen T, Boe Møller M, Ackermann L, et al. Multidisciplinary Management of Mastocytosis: Nordic Expert Group Consensus. *Acta Derm Venereol.* 2016;96(5):602-12
375. Escribano L, González-Olano D, de la Hoz B, Esteban I, Sánchez-Fernández C. Mastocytosis. En: Peláez A, Dávila I, editores. *Tratado de Alergología.* Madrid: Ergon;2007:1241–59.
376. de la Hoz B, González de Olano D, Alvarez I, Sánchez L, Núñez R, Sánchez I, et al. Guías clínicas para el diagnóstico, tratamiento y seguimiento de las mastocitosis. *An Sist Sanit Navar.* 2008;31(1):11–32.
377. Matito A, Alvarez-Twose I, Morgado JM, Sánchez-Muñoz L, Orfao A, Escribano L. Anaphylaxis as a clinical manifestation of clonal mast cell disorders. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2014;14(8):450.
378. Dewachter P, Castells MC, Hepner DL, Mouton-Faivre C. Perioperative management of patients with mastocytosis. *Anesthesiology.* 2014;120(3):753–9.
379. Siebenhaar F, Akin C, Bindslev-Jensen C, Maurer M, Broesby-Olsen S. Treatment strategies in mastocytosis. *Immunol Allergy Clin North Am.* 2014;34(2):433–47.
380. Roberts LJ, Turk JW, Oates JA. Shock syndrome associated with mastocytosis: pharmacologic reversal of the acute episode and therapeutic prevention of recurrent attacks. *Adv Shock Res.* 1982;8:145–52.
381. Lorcerie B, Arveux I, Chauffert B, Dalac S, Lambert D, Martin F. Aspirin and systemic mastocytosis. *Lancet.* 1989;2(8672):1155.
382. Butterfield JH, Weiler CR. Prevention of mast cell activation disorder-associated clinical sequelae of excessive prostaglandin D(2) production. *Int Arch Allergy Immunol.* 2008;147(4):338–43.
383. Moreno-Borque R, Matito A, Álvarez-Twose I, Morgado JM, Sánchez-Muñoz L, Orfao A, et al. Response to celecoxib in a patient with indolent systemic mastocytosis presenting with intractable diarrhea. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2015;115(5):456–7.
384. Escribano L, Akin C, Castells M, Schwartz LB. Current options in the treatment of mast cell mediator-related symptoms in mastocytosis. *Inflamm Allergy Drug Targets.* 2006;5(1):61–77.
385. Kettelhut BV, Berkebile C, Bradley D, Metcalfe DD. A double-blind, placebo-controlled, crossover trial of ketotifen versus hydroxyzine in the treatment of pediatric mastocytosis. *J Allergy Clin Immunol.* 1989;83(5):866–70.
386. Metcalfe DD. The treatment of mastocytosis: an overview. *J Invest Dermatol.* 1991;96(3):55S–56S.
387. Escribano L, Akin C, Castells M, Orfao A, Metcalfe DD. Mastocytosis: current concepts in diagnosis and treatment. *Ann Hematol.* 2002;81(12):677–90.

388. Worobec AS, Metcalfe DD. Mastocytosis: current treatment concepts. *Int Arch Allergy Immunol*. 2002;127(2):153–5.
389. Worobec AS. Treatment of systemic mast cell disorders. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2000;14(3):659–87.
390. Cardet JC, Akin C, Lee MJ. Mastocytosis: update on pharmacotherapy and future directions. *Expert Opin Pharmacother*. 2013;14(15):2033–45.
391. Weller K, Maurer M. Desloratadine inhibits human skin mast cell activation and histamine release. *J Invest Dermatol*. 2009;129(11):2723–6.
392. Okayama Y, Church MK. Comparison of the modulatory effect of ketotifen, sodium cromoglycate, procaterol and salbutamol in human skin, lung and tonsil mast cells. *Int Arch Allergy Immunol*. 1992;97(3):216–25.
393. Siebenhaar F, Förtsch A, Krause K, Weller K, Metz M, Magerl M, *et al*. Rupatadine improves quality of life in mastocytosis: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Allergy*. 2013;68(7):949–52.
394. Macpherson JL, Kemp A, Rogers M, Mallet AI, Toia RF, Spur B, *et al*. Occurrence of platelet-activating factor (PAF) and an endogenous inhibitor of platelet aggregation in diffuse cutaneous mastocytosis. *Clin Exp Immunol*. 1989;77(3):391–6.
395. Gasior-Chrzan B, Falk ES. Systemic mastocytosis treated with histamine H1 and H2 receptor antagonists. *Dermatology*. 1992;184(2):149–52.
396. Hirschowitz BI, Groarke JF. Effect of cimetidine on gastric hypersecretion and diarrhea in systemic mastocytosis. *Ann Intern Med*. 1979;90(5):769–71.
397. Bredfeldt JE, O’Laughlin JC, Durham JB, Blessing LD. Malabsorption and gastric hyperacidity in systemic mastocytosis. Results of cimetidine therapy. *Am J Gastroenterol*. 1980;74(2):133–7.
398. Berg MJ, Bernhard H, Schentag JJ. Cimetidine in systemic mastocytosis. *Drug Intell Clin Pharm*. 1981;15(3):180–3.
399. Tolar J, Tope WD, Neglia JP. Leukotriene-receptor inhibition for the treatment of systemic mastocytosis. *N Engl J Med*. 2004;350(7):735–6.
400. Sancho-Chust JN, Chiner E, Camarasa A, Llombart M. Recent-onset bronchial asthma as a manifestation of systemic mastocytosis. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2009;19(6):513–5.
401. Turner PJ, Kemp AS, Rogers M, Mehr S. Refractory symptoms successfully treated with leukotriene inhibition in a child with systemic mastocytosis. *Pediatr Dermatol*. 2012 Apr;29(2):222–3.
402. Rodriguez T, Pfeiffer M, Levy BD, Castells M. Lipid Mediators in Cutaneous and Systemic Mastocytosis and the Impact of 5-LO Inhibition. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;127:AB132.

403. Sánchez-Matas I, Matito A, González-de-Olano D, Alvarez-Twose I, Sánchez-Muñoz L, de la Hoz B, *et al.* Prevalence of hypersensitivity reactions to nonsteroidal anti-inflammatory drugs in 212 patients with mastocytosis in Spain. *Allergy*. 2009;64:574–5.
404. Bonadonna P, Pagani M, Aberer W, Bilò MB, Brockow K, Oude Elberink H, *et al.* Drug hypersensitivity in clonal mast cell disorders: ENDA/EAACI position paper. *Allergy*. 2015;70(7):755–63.
405. Martin MW, O’Sullivan AJ, Gomperts BD. Inhibition by cromoglycate and some flavonoids of nucleoside diphosphate kinase and of exocytosis from permeabilized mast cells. *Br J Pharmacol*. 1995;115(6):1080–6.
406. Norris AA. The effects of nedocromil sodium and sodium cromoglycate on airway nerves and neurogenic responses in asthma. *Pulm Pharmacol*. 1995;8(4-5):227–30.
407. Yoshimi A, Hashizume H, Kitagawa M, Nishimura K, Takeya N. Absorption mechanism of 1,3-bis(2-ethoxycarbonylchromon-5-yl-oxy)-2-((S)-lysiloxy)propane dihydrochloride (N-556), a prodrug for the oral delivery of disodium cromoglycate. *Biol Pharm Bull*. 1993;16(4):375–8.
408. Soter NA, Austen KF, Wasserman SI. Oral disodium cromoglycate in the treatment of systemic mastocytosis. *N Engl J Med*. 1979;301(9):465–9.
409. Vieira Dos Santos R, Magerl M, Martus P, Zuberbier T, Church MK, Escribano L, *et al.* Topical sodium cromoglycate relieves allergen- and histamine-induced dermal pruritus. *Br J Dermatol*. 2010;162(3):674–6.
410. Edwards AM, Capková S. Oral and topical sodium cromoglycate in the treatment of diffuse cutaneous mastocytosis in an infant. *BMJ Case Rep*. 2011;2011.
411. Kaplan AP, Joseph K, Maykut RJ, Geba GP, Zeldin RK. Treatment of chronic autoimmune urticaria with omalizumab. *J Allergy Clin Immunol*. 2008;122(3):569–73.
412. McCormack PL. Omalizumab: a review of its use in patients with chronic spontaneous urticaria. *Drugs*. 2014;74(14):1693–9.
413. Busse W, Corren J, Lanier BQ, McAlary M, Fowler-Taylor A, Cioppa GD, *et al.* Omalizumab, anti-IgE recombinant humanized monoclonal antibody, for the treatment of severe allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2001;108(2):184–90.
414. Samitas K, Delimpoura V, Zervas E, Gaga M. Anti-IgE treatment, airway inflammation and remodelling in severe allergic asthma: current knowledge and future perspectives. *Eur Respir Rev*. 2015;24(138):594–601.
415. Carter MC, Robyn JA, Bressler PB, Walker JC, Shapiro GG, Metcalfe DD. Omalizumab for the treatment of unprovoked anaphylaxis in patients with systemic mastocytosis. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;119(6):1550–1.

416. Siebenhaar F, Kühn W, Zuberbier T, Maurer M. Successful treatment of cutaneous mastocytosis and Ménière disease with anti-IgE therapy. *J Allergy Clin Immunol.* 2007;120(1):213–5.
417. Douglass JA, Carroll K, Voskamp A, Bourke P, Wei A, O’Hehir RE. Omalizumab is effective in treating systemic mastocytosis in a nonatopic patient. *Allergy.* 2010;65(7):926–7.
418. Bell MC, Jackson DJ. Prevention of anaphylaxis related to mast cell activation syndrome with omalizumab. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2012;108(5):383–4.
419. Matito A, Blázquez-Goñi C, Morgado JM, Alvarez-Twose I, Mollejo M, Sánchez-Muñoz L, *et al.* Short-term omalizumab treatment in an adolescent with cutaneous mastocytosis. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2013;111(5):425–6.
420. Jagdis A, Vadas P. Omalizumab effectively prevents recurrent refractory anaphylaxis in a patient with monoclonal mast cell activation syndrome. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2014;113(1):115–6.
421. Kontou-Fili K. High omalizumab dose controls recurrent reactions to venom immunotherapy in indolent systemic mastocytosis. *Allergy.* 2008;63(3):376–8.
422. da Silva EN, Randall KL. Omalizumab mitigates anaphylaxis during ultrarush honey bee venom immunotherapy in monoclonal mast cell activation syndrome. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2013;1(6):687–8.
423. Sokol KC, Ghazi A, Kelly BC, Grant JA. Omalizumab as a desensitizing agent and treatment in mastocytosis: a review of the literature and case report. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2014;2(3):266–70.
424. Godt O, Proksch E, Streit V, Christophers E. Short- and long-term effectiveness of oral and bath PUVA therapy in urticaria pigmentosa and systemic mastocytosis. *Dermatology.* 1997;195(1):35–9.
425. Krönauer C, Eberlein-König B, Ring J, Behrendt H. Influence of UVB, UVA and UVA1 irradiation on histamine release from human basophils and mast cells in vitro in the presence and absence of antioxidants. *Photochem Photobiol.* 2003;77(5):531–4.
426. Guhl S, Hartmann K, Tapkenhinrichs S, Smorodchenko A, Grützkau A, Henz BM, *et al.* Ultraviolet irradiation induces apoptosis in human immature, but not in skin mast cells. *J Invest Dermatol.* 2003;121(4):837–44.
427. Kinsler VA, Hawk JLM, Atherton DJ. Diffuse cutaneous mastocytosis treated with psoralen photochemotherapy: case report and review of the literature. *Br J Dermatol.* 2005;152(1):179–80.
428. Stege H, Schöpf E, Ruzicka T, Krutmann J. High-dose UVA1 for urticaria pigmentosa. *Lancet.* 1996;347(8993):64.

429. Smith ML, Orton PW, Chu H, Weston WL. Photochemotherapy of dominant, diffuse, cutaneous mastocytosis. *Pediatr Dermatol.* 1990;7(4):251–5.
430. Escribano L, Garcia-Belmonte D, Hernández-González A, Otheo E, Nuñez-López R, Vázquez JL, *et al.* Successful management of a case of diffuse cutaneous mastocytosis with recurrent anaphylactoid episodes and hypertension. *J Allergy Clin Immunol.* 2004;113:S335.
431. Gobello T, Mazzanti C, Sordi D, Annessi G, Abeni D, Chinni LM, *et al.* Medium-versus high-dose ultraviolet A1 therapy for urticaria pigmentosa: a pilot study. *J Am Acad Dermatol.* 2003;49(4):679–84.
432. Bonadonna P, Bonifacio M, Lombardo C, Zanotti R. Hymenoptera Allergy and Mast Cell Activation Syndromes. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2016;16(1):5.
433. Bonadonna P, Zanotti R, Müller U. Mastocytosis and insect venom allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2010;10(4):347–53.
434. Niedoszytko M, Bonadonna P, Oude Elberink JNG, Golden DBK. Epidemiology, diagnosis, and treatment of Hymenoptera venom allergy in mastocytosis patients. *Immunol Allergy Clin North Am.* 2014;34(2):365–81.
435. Ruëff F, Przybilla B, Biló MB, Müller U, Scheipl F, Aberer W, *et al.* Predictors of severe systemic anaphylactic reactions in patients with Hymenoptera venom allergy: importance of baseline serum tryptase—a study of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology Interest Group on Insect Venom Hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol.* 2009;124(5):1047–54.
436. González-de-Olano D, Alvarez-Twose I, Vega A, Orfao A, Escribano L. Venom immunotherapy in patients with mastocytosis and hymenoptera venom anaphylaxis. *Immunotherapy.* 2011;3(5):637–51.
437. Bonadonna P, Gonzalez-de-Olano D, Zanotti R, Riccio A, De Ferrari L, Lombardo C, *et al.* Venom immunotherapy in patients with clonal mast cell disorders: efficacy, safety, and practical considerations. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2013;1(5):474–8.
438. Oude Elberink JN, de Monchy JG, Kors JW, van Doormaal JJ, Dubois AE. Fatal anaphylaxis after a yellow jacket sting, despite venom immunotherapy, in two patients with mastocytosis. *J Allergy Clin Immunol.* 1997;99(1 Pt 1):153–4.
439. Lehmann T, Lämmle B. IFNalpha treatment in systemic mastocytosis. *Ann Hematol.* 1999;78(10):483–4.
440. Tefferi A, Li CY, Butterfield JH, Hoagland HC. Treatment of systemic mast-cell disease with cladribine. *N Engl J Med.* 2001;344(4):307–9.
441. Hauswirth AW, Simonitsch-Klupp I, Uffmann M, Koller E, Sperr WR, Lechner K, *et al.* Response to therapy with interferon alpha-2b and prednisolone in aggressive systemic mastocytosis: report of five cases and review of the literature. *Leuk Res.* 2004;28(3):249–57.

442. Barete S, Lortholary O, Damaj G, Hirsch I, Chandesris MO, Elie C, *et al.* Long-term efficacy and safety of cladribine (2-CdA) in adult patients with mastocytosis. *Blood*. 2015;126(8):1009–16.
443. Schleyer V, Meyer S, Landthaler M, Szeimies R-M. [“Smoldering systemic mastocytosis.” Successful therapy with cladribine]. *Hautarzt*. 2004;55(7):658–62.
444. Van Den Neste E, Delannoy A, Feremans W, Ferrant A, Michaux L. Second primary tumors and immune phenomena after fludarabine or 2-chloro-2'-deoxyadenosine treatment. *Leuk Lymphoma*. 2001;40(5-6):541–50.
445. Ustun C, Corless CL, Savage N, Fiskus W, Manaloor E, Heinrich MC, *et al.* Chemotherapy and dasatinib induce long-term hematologic and molecular remission in systemic mastocytosis with acute myeloid leukemia with KIT D816V. *Leuk Res*. 2009;33(5):735–41.
446. Ustun C, Gotlib J, Popat U, Artz A, Litzow M, Reiter A, *et al.* Consensus Opinion on Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation in Advanced Systemic Mastocytosis. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2016;22(8):1348-56.
447. Lehmann T, Beyeler C, Lämmle B, Hunziker T, Vock P, Olah AJ, *et al.* Severe osteoporosis due to systemic mast cell disease: successful treatment with interferon alpha-2B. *Br J Rheumatol*. 1996;35(9):898–900.
448. Agarwala MK, George R, Mathews V, Balasubramanian P, Thomas M, Nair S. Role of imatinib in the treatment of pediatric onset indolent systemic mastocytosis: a case report. *J Dermatolog Treat*. 2013;24(6):481–3.
449. Pardanani A, Ketterling RP, Brockman SR, Flynn HC, Paternoster SF, Shearer BM, *et al.* CHIC2 deletion, a surrogate for FIP1L1-PDGFRα fusion, occurs in systemic mastocytosis associated with eosinophilia and predicts response to imatinib mesylate therapy. *Blood*. 2003;102(9):3093–6.
450. Pardanani A, Elliott M, Reeder T, Li CY, Baxter EJ, Cross NCP, *et al.* Imatinib for systemic mast-cell disease. *Lancet*. 2003;362(9383):535–6.
451. Elliott MA, Pardanani A, Li CY, Tefferi A. Immunophenotypic normalization of aberrant mast cells accompanies histological remission in imatinib-treated patients with eosinophilia-associated mastocytosis. *Leukemia*. 2004;18(5):1027–9.
452. Dalal BI, Horsman DE, Bruyère H, Forrest DL. Imatinib mesylate responsiveness in aggressive systemic mastocytosis: novel association with a platelet derived growth factor receptor beta mutation. *Am J Hematol*. 2007;82(1):77–9.
453. Lahortiga I, Akin C, Cools J, Wilson TM, Mentens N, Arthur DC, *et al.* Activity of imatinib in systemic mastocytosis with chronic basophilic leukemia and a PRKG2-PDGFRβ fusion. *Haematologica*. 2008;93(1):49–56.
454. Hochhaus A, Baccarani M, Giles FJ, le Coutre PD, Müller MC, Reiter A, *et al.* Nilotinib in patients with systemic mastocytosis: analysis of the phase 2,

- open-label, single-arm nilotinib registration study. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2015;141(11):2047–60.
455. Verstovsek S, Tefferi A, Cortes J, O'Brien S, Garcia-Manero G, Pardanani A, *et al*. Phase II study of dasatinib in Philadelphia chromosome-negative acute and chronic myeloid diseases, including systemic mastocytosis. *Clin Cancer Res*. 2008;14(12):3906–15.
 456. Paul C, Sans B, Suarez F, Casassus P, Barete S, Lanternier F, *et al*. Masitinib for the treatment of systemic and cutaneous mastocytosis with handicap: a phase 2a study. *Am J Hematol*. 2010;85(12):921–5.
 457. Lortholary O, Chandesris MO, Bulai Livideanu C, Paul C, Guillet G, Jassem E, *et al*. Masitinib for treatment of severely symptomatic indolent systemic mastocytosis: a randomised, placebo-controlled, phase 3 study. *Lancet*. 2017;389(10069):612–620.
 458. Gotlib J, Kluin-Nelemans HC, George TI, Akin C, Sotlar K, Hermine O, *et al*. Efficacy and Safety of Midostaurin in Advanced Systemic Mastocytosis. *N Engl J Med*. 2016;374(26):2530–41.
 459. Ustun C, Reiter A, Scott BL, Nakamura R, Damaj G, Kreil S, *et al*. Hematopoietic stem-cell transplantation for advanced systemic mastocytosis. *J Clin Oncol*. 2014;32(29):3264–74.
 460. Valent P. Mast cell activation syndromes: definition and classification. *Allergy*. 2013;68(4):417–24.
 461. Picard M, Giavina-Bianchi P, Mezzano V, Castells M. Expanding spectrum of mast cell activation disorders: monoclonal and idiopathic mast cell activation syndromes. *Clin Ther*. 2013;35(5):548–62.
 462. Akin C, Valent P, Metcalfe DD. Mast cell activation syndrome: Proposed diagnostic criteria. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;126(6):1099–104.e4.
 463. Afrin LB, Butterfield JH, Raithel M, Molderings GJ. Often seen, rarely recognized: mast cell activation disease--a guide to diagnosis and therapeutic options. *Ann Med*. 2016;48(3):190–201.
 464. Molderings GJ, Haenisch B, Brettner S, Homann J, Menzen M, Dumoulin FL, *et al*. Pharmacological treatment options for mast cell activation disease. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2016;389(7):671–94.
 465. Zanotti R, Lombardo C, Passalacqua G, Caimmi C, Bonifacio M, De Matteis G, *et al*. Clonal mast cell disorders in patients with severe Hymenoptera venom allergy and normal serum tryptase levels. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;136(1):135–9.
 466. Sánchez-Muñoz L, Morgado JM, Álvarez-Twose I, Matito A, Garcia-Montero AC, Teodosio C, *et al*. Diagnosis and classification of mastocytosis in non-specialized versus reference centres: a Spanish Network on Mastocytosis (REMA) study on 122 patients. *Br J Haematol*. 2016;172(1):56–63.

467. Unna P. Beitrage zur anatomic und pathogenese der urticaria simplex und pigmentosa. *M Schr Prakt Dermatol Suppl Dermatol Stud.* 1887;3:9.
468. Escribano L, Orfao A, Díaz-Agustin B, Villarrubia J, Cerveró C, López A, *et al.* Indolent systemic mast cell disease in adults: immunophenotypic characterization of bone marrow mast cells and its diagnostic implications. *Blood.* 1998;91(8):2731–6.
469. Sánchez-Muñoz L, Teodosio C, Morgado JMT, Perbellini O, Mayado A, Alvarez-Twose I, *et al.* Flow cytometry in mastocytosis: utility as a diagnostic and prognostic tool. *Immunol Allergy Clin North Am.* 2014;34(2):297–313.
470. Valent P, Escribano L, Broesby-Olsen S, Hartmann K, Grattan C, Brockow K, *et al.* Proposed diagnostic algorithm for patients with suspected mastocytosis: a proposal of the European Competence Network on Mastocytosis. *Allergy.* 2014;69(10):1267–74.
471. Afonja O, Amorosi E, Ashman L, Takeshita K. Multilineage involvement and erythropoietin-“independent” erythroid progenitor cells in a patient with systemic mastocytosis. *Ann Hematol.* 1998;77(4):183–6.
472. Sotlar K, Marafioti T, Griesser H, Theil J, Aepinus C, Jaussi R, *et al.* Detection of c-kit mutation Asp 816 to Val in microdissected bone marrow infiltrates in a case of systemic mastocytosis associated with chronic myelomonocytic leukaemia. *Mol Pathol.* 2000;53(4):188–93.
473. Mayado A, Teodosio C, Garcia-Montero AC, Matito A, Rodriguez-Caballero A, Morgado JM, *et al.* Increased IL6 plasma levels in indolent systemic mastocytosis patients are associated with high risk of disease progression. *Leukemia.* 2016;30(1):124–30.
474. Schwartz LB. Clinical utility of tryptase levels in systemic mastocytosis and associated hematologic disorders. *Leuk Res.* 2001;25(7):553–62.
475. Kosnik M. Anaphylaxis to venom without IgE antibody. *Allergy.* 2000;55(7):676–7.
476. Golden DBK, Tracy JM, Freeman TM, Hoffman DR, Insect Committee of the American Academy of Allergy, Asthma and Immunology. Negative venom skin test results in patients with histories of systemic reaction to a sting. *J Allergy Clin Immunol.* 2003;112(3):495–8.
477. Kränke B, Sturm G, Aberer W. Negative venom skin test results and mastocytosis. *J Allergy Clin Immunol.* 2004;113(1):180–1.
478. van der Linden PW, Hack CE, Struyvenberg A, van der Zwan JK. Insect-sting challenge in 324 subjects with a previous anaphylactic reaction: current criteria for insect-venom hypersensitivity do not predict the occurrence and the severity of anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol.* 1994;94(2 Pt 1):151–9.

479. Müller U, Helbling A, Hunziker T, Wüthrich B, Péroud A, Gilardi S, *et al.* Mastocytosis and atopy: a study of 33 patients with urticaria pigmentosa. *Allergy*. 1990;45(8):597–603.
480. Huang L, Wang SA, Konoplev S, Bueso-Ramos CE, Thakral B, Miranda RN, *et al.* Well-differentiated systemic mastocytosis showed excellent clinical response to imatinib in the absence of known molecular genetic abnormalities: A case report. *Medicine (Baltimore)*. 2016;95(41):e4934.
481. Hartmann K, Bruns SB, Henz BM. Mastocytosis: review of clinical and experimental aspects. *J Investig Dermatol Symp Proc*. 2001;6(2):143–7.
482. Kristensen T, Broesby-Olsen S, Vestergaard H, Bindslev-Jensen C, Møller MB. KIT D816V mutation-positive cell fractions in lesional skin biopsies from adults with systemic mastocytosis. *Dermatology*. 2013;226(3):233–7.
483. Droogendijk HJ, Kluin-Nelemans HJC, van Doormaal JJ, Oranje AP, van de Loosdrecht AA, van Daele PLA. Imatinib mesylate in the treatment of systemic mastocytosis: a phase II trial. *Cancer*. 2006;107(2):345–51.
484. Merante S, Serena M, Chichino G, Guido C, Boveri E, Emanuela B, *et al.* First case of an AIDS patient with systemic mast cell disease associated with FIP1-positive eosinophilia treated with imatinib mesylate therapy. *J Clin Oncol*. 2006;24(4):e6–7.
485. Florian S, Esterbauer H, Binder T, Müllauer L, Haas OA, Sperr WR, *et al.* Systemic mastocytosis (SM) associated with chronic eosinophilic leukemia (SM-CEL): detection of FIP1L1/PDGFRalpha, classification by WHO criteria, and response to therapy with imatinib. *Leuk Res*. 2006;30(9):1201–5.
486. Agis H, Sotlar K, Valent P, Horny H-P. Ph-Chromosome-positive chronic myeloid leukemia with associated bone marrow mastocytosis. *Leuk Res*. 2005;29(10):1227–32.
487. Vega-Ruiz A, Cortes JE, Sever M, Manshouri T, Quintás-Cardama A, Luthra R, *et al.* Phase II study of imatinib mesylate as therapy for patients with systemic mastocytosis. *Leuk Res*. 2009;33(11):1481–4.
488. Pagano L, Valentini CG, Caira M, Rondoni M, Van Lint MT, Candoni A, *et al.* Advanced mast cell disease: an Italian Hematological Multicenter experience. *Int J Hematol*. 2008;88(5):483–8.
489. Jung AG, Horny H-P, Sotlar K, Overbeck T, Schön MP, Lippert U. Imatinib mesylate for aggressive systemic mastocytosis with long bone osteolysis. *J Am Acad Dermatol*. 2011;65(1):224–6.
490. Pardanani A, Tefferi A. A critical reappraisal of treatment response criteria in systemic mastocytosis and a proposal for revisions. *Eur J Haematol*. 2010;84(5):371–8.

491. Pottier P, Planchon B, Grossi O. [Complete remission with imatinib mesylate (Glivec) of an idiopathic hypereosinophilic syndrome associated with a cutaneous mastocytosis after failure of interferon-alpha]. *Rev Med Interne*. 2003;24(8):542–6.
492. Hennessy B, Giles F, Cortes J, O'Brien S, Ferrajoli A, Ossa G, *et al*. Management of patients with systemic mastocytosis: review of M. D. Anderson Cancer Center experience. *Am J Hematol*. 2004;77(3):209–14.
493. Musto P, Falcone A, Sanpaolo G, Bodenizza C, Carella AM. Inefficacy of imatinib-mesylate in sporadic, aggressive systemic mastocytosis. *Leuk Res*. 2004;28(4):421–2.
494. Pardanani A, Brockman SR, Paternoster SF, Flynn HC, Ketterling RP, Lasho TL, *et al*. FIP1L1-PDGFR α fusion: prevalence and clinicopathologic correlates in 89 consecutive patients with moderate to severe eosinophilia. *Blood*. 2004;104(10):3038–45.
495. Kupfer SS, Hart J, Mohanty SR. Aggressive systemic mastocytosis presenting with hepatic cholestasis. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2007;19(10):901–5.
496. Gollard RP, Ruemmler-Fish C, Garcia D. Systemic Mastocytosis: documented pathologic response to imatinib. *Eur J Haematol*. 2007;79(4):367–8.
497. Koenig M, Morel J, Reynaud J, Varvat C, Cathébras P. An unusual cause of spontaneous bleeding in the intensive care unit - mastocytosis: a case report. *Cases J*. 2008;1(1):100.
498. Valentini CG, Rondoni M, Pogliani EM, Van Lint MT, Cattaneo C, Marbello L, *et al*. Mast cell leukemia: a report of ten cases. *Ann Hematol*. 2008;87(6):505–8.
499. Yoshida C, Takeuchi M, Tsuchiyama J, Sadahira Y. Successful treatment of KIT D816V-positive, imatinib-resistant systemic mastocytosis with interferon-alpha. *Intern Med*. 2009;48(22):1973–8.
500. Moore AE, Johnston WH, Hever A, Peng S, Kujubu DA. Systemic mastocytosis presenting with acute oliguric renal failure: report of a case and review of the literature. *Int Urol Nephrol*. 2012;44(2):639–42.
501. Speight RA, Nicolle A, Needham SJ, Verrill MW, Bryon J, Panter S. Rare, germline mutation of KIT with imatinib-resistant multiple GI stromal tumors and mastocytosis. *J Clin Oncol*. 2013;31(16):e245–7.
502. Morren MA, Hoppe A, Renard M, Debiec RM, Uyttendaele A, Dubreuil P, *et al*. Imatinib mesylate in the treatment of diffuse cutaneous mastocytosis. *J Pediatr*. 2013;162(1):205–7.
503. Vannorsdall EJ, Collins JA, Chen QC, Sarai G, Baer MR. Symptomatic response to imatinib mesylate in cutaneous mastocytosis associated with chronic myelomonocytic leukemia. *Curr Oncol*. 2013;20(4):e349–53.

504. Sakane-Ishikawa E, Kodaka T, Tsunemine H, Itoh K, Akasaka H, Kusama T, *et al.* Eosinophilia and bone lesion as clinical manifestations of aggressive systemic mastocytosis. *J Clin Exp Hematop.* 2013;53(3):207–13.
505. Iliakis T, Rougkala N, Diamantopoulos PT, Papadopoulou V, Kalala F, Zervakis K, *et al.* An adult patient with systemic mastocytosis and B-acute lymphoblastic leukemia. *Case Rep Med.* 2014;2014:526129.
506. Valent P, Cerny-Reiterer S, Hoermann G, Sperr WR, Mullauer L, Mannhalter C, *et al.* Long-lasting complete response to imatinib in a patient with systemic mastocytosis exhibiting wild type KIT. *Am J Blood Res.* 2014;4(2):93–100.
507. Marton I, Pósfaí É, Borbényi Z, Bödör C, Papp G, Demeter J, *et al.* Therapeutic challenge during the long-term follow-up of a patient with indolent systemic mastocytosis with extensive cutaneous involvement. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2015;19(9):1607–9.
508. Petersdorf SH, Kopecky KJ, Slovak M, Willman C, Nevill T, Brandwein J, *et al.* A phase 3 study of gemtuzumab ozogamicin during induction and post-consolidation therapy in younger patients with acute myeloid leukemia. *Blood.* 2013;121(24):4854–60.
509. van der Velden V, Marvelde JG Te, Hoogeveen PG, Bernstein ID, Houtsmuller AB, Berger MS, *et al.* Targeting of the CD33-calicheamicin immunoconjugate Mylotarg (CMA-676) in acute myeloid leukemia: in vivo and in vitro saturation and internalization by leukemic and normal myeloid cells. *Blood.* 2001;97(10):3197–204.
510. Moro JA, Almenar L, Jarque I, Martinez-Dolz L, Hernández MD, Crespo M, *et al.* Heart transplantation in a patient with systemic mastocytosis. *J Heart Lung Transplant.* 2008;27(6):689–91.
511. Borate U, Mehta A, Reddy V, Tsai M, Josephson N, Schnadig I. Treatment of CD30-positive systemic mastocytosis with brentuximab vedotin. *Leuk Res.* 2016;44:25–31.
512. Krauth M-T, Böhm A, Agis H, Sonneck K, Samorapoompichit P, Florian S, *et al.* Effects of the CD33-targeted drug gemtuzumab ozogamicin (Mylotarg) on growth and mediator secretion in human mast cells and blood basophils. *Exp Hematol.* 2007;35(1):108–16.
513. Jeong D, Fauman K, Ross C, Akin C, Mody R. Successful treatment of systemic mastocytosis associated with AML-M2, t (8: 21) in a child using MRC-based AML chemotherapy along with gemtuzumab. *J Allergy Clin Immunol.* 2007;119 (Suppl. 1):S207.
514. Borthakur G. Precision “re”arming of CD33 antibodies. *Blood.* 2013;122(8):1334.

